

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEMOZOLOMİD VE GENİSTEİN YÜKLÜ POLİMERİK  
NANOPARTİKÜLLERİN ANTI-PROLİFERATİF VE APOPTOTİK  
ETKİLERİNİN İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE  
KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ

İrem METEOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ

Haziran, 2021

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TEMOZOLOMİD VE GENİSTEİN YÜKLÜ POLİMERİK  
NANOPARTİKÜLLERİN ANTI-PROLİFERATİF VE APOPTOTİK  
ETKİLERİNİN İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE  
KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

İrem METEOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 07.06.2021 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

Doç. Dr. Kadriye KIZILBEY, Üye

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ sorumluluğunda tarafımda hazırlanan "Temozolomid ve Genistein Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Anti-Proliferatif ve Apoptotik Etkilerinin İnsan Glioblastoma Hücrelerinde Karşılaştırmalı Analizi" 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.

İrem METEOĞLU

İmza

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FYL-2019-3780 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 ve tez çalışmam boyunca her aşamada akademik yolumu aydınlatan, ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerini paylaşan, çalışma azmi ile örnek olan, hayatıma sadece akademik değil sosyal ve kültürel yönlerden de birçok şey katan, hayata daha olumlu bakmamı sağlayan değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ'a,

Deneyletimde laboratuvardaki tüm imkânları sonuna kadar sunan, deneyim kazanmamda çok büyük emeği olan sayın Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU'na,

Çalışmalarım boyunca, birikimlerini her an tüm içtenliği ile benimle paylaşan, birlikte paylaştığımız tüm güzellikler için R. Dilsu ÇOLPAN'na, iyi ve kötü zamanlarımda yanımda olan ve beni sonuna kadar destekleyen, hayatımda birçok güzel anının başrolü Gülşah AKBAŞ'a, bakışarak anlaştığım her konuda desteklerini ve samimi görüşlerini paylaşan F. Şayan POYRAZ'a, yüksek lisansa başladığım ilk andan bu yana hep yanımda olan, beni yüreklendiren ve her daim mutlu eden S. Pınar ÖZTEKİN'e, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan ve bundan sonraki yaşamımın her anında çok daha güzel ve özel anları paylaşmak istediğim Elif ARSLAN, Cansel KAYA, Emrah BERTAN, F. Ceren KIRMIZITAŞ, A. Bilal ÖZTÜRK, Sefanur ERDÖL, H. Nur AYDIN, Kübra TRABZONLU, Tuğba ATABEY, A. Furkan ÇALIŞ, İlgül AKYAMAN'a,

Berber yaşadığımız süre boyunca beni motive eden ve yardımlarını esirgemeyen Aleyna ULUSOY, Gözde ENGÜVEN, Buse YELKOVAN, Merve YENİOĞLU'na,

Mesafelere rağmen hayatımın her döneminde, en zor anlarımda benimle olan Şeyma GÜLAL'a, liseden beri samimi dostluklarını benden esirgemeyen Dr.Yavuz Selim AYDINALP, Sena ÖZCAN'a, sıcacık yürekleri ile hep yanımda olan Eda ATEŞ, Merve SALTİK, Sinem SÜMER BEKİZ, Sevde Büşra ÖZKAN,

Tanıdığım ilk günden beri, her türlü zorluğa katlanmama yardımcı olan, çalışkanlığı, inancı, fedakârlığı, yaşantıma kattığı her türlü güzellik için Deniz YAZICI'ya,

Hayatım boyunca desteklerini, şefkatlerini ve sevgilerini benden esirgemeyen, beni her zaman doğru ve iyi bir insan olmaya yönlendiren, hayatımdaki en değerli varlıklar, yaşamımdaki yol göstericim babam Dr. Hikmet METEOĞLU, varlığıyla gurur duyduğum, beni her zaman ayakta tutan idolüm annem Dr. Nazan METEOĞLU, sevgisini kelimelerle ifade edemediğim ablası olduğum için çok şanslı olduğum Nihat Teoman METEOĞLU'na teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, 1649B021904149 proje numarası ile TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlar Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

İrem METEOĞLU

# İÇİNDEKİLER

<b>SİMGE LİSTESİ</b>	<b>X</b>
<b>KISALTMA LİSTESİ</b>	<b>XI</b>
<b>ÖZET</b>	<b>XVI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XVIII</b>
<b>1 GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	2
1.3 Hipotez.....	3
<b>2 GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1 Kanser ve Hücre Döngüsü.....	4
2.2 Glioblastoma.....	7
2.2.1 Glioblastoma Tedavisi.....	9
2.3 Flavonoidler.....	11
2.3.1 Kanserde Flavonoidler.....	13
2.3.2 Genistein.....	14
2.4 İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	17
2.4.1 Nanopartiküller.....	19
<b>3 MATERYAL VE YÖNTEM</b>	<b>24</b>
3.1 Materyal.....	24
3.1.1 Kullanılan Cihazlar.....	24
3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler.....	25
3.1.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	26
3.1.4 Kullanılan Solüsyonlar ve Tamponlar.....	28
3.2 Yöntem.....	33
3.2.1 Temozolomid Molekülünün UV Standart Eğrisi.....	33
3.2.2 Genistein Molekülünün UV Standart Eğrisi.....	33
3.2.3 Tekli Emülsiyon Çözücü Uçurma Metodu (o/w) ile Temozolomid, Genistein ve Temozolomid-Genistein Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi.....	33
3.2.4 Temozolomid, Genistein, Temozolomid-Genistein Yüklü Nanopartiküllerin Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Etken Madde Yüklenme Veriminin Hesaplanması.....	34



3.2.5 Reaksiyon Veriminin (RV) Hesaplanması.....	34
3.2.6 Etken Madde Yüklenme Veriminin (DL) Hesaplanması.....	34
3.2.7 Enkapsülasyon Etkinliğinin (EE) Hesaplanması.....	35
3.2.8 Temozolomid-Genistein Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	35
3.2.9 Temozolomid-Genistein Nanopartiküllerin İn-vitro Salımı.....	36
3.2.10 İnsan Glioblastoma Hücre Hattının (U87MG) Kültüre Edilmesi.....	37
3.2.11 İnsan Glioblastoma Hücre Hattının (U87MG) Açılması.....	37
3.2.12 İnsan Glioblastoma Hücre Hattının (U87MG) Pasajlanması.....	37
3.2.13 İnsan Glioblastoma Hücrelerinin (U87MG) Sayımı.....	38
3.2.14 İnsan Glioblastoma Hücrelerini (U87MG) Dondurulması.....	38
3.2.15 Temozolomid-Genistein Nanopartiküllerin <i>in vitro</i> Biyolojik Etkinliğinin Araştırılması.....	39
<b>4 SONUÇLAR VE TARTIŞMA</b>	<b>50</b>
4.1 Temozolomid ve Genistein Moleküllerine Ait UV-Vis Spektrumları ve Kalibrasyon Eğrileri.....	50
4.1.1 Temozolomid Molekülüne Ait UV-Vis Spektrumu ve Kalibrasyon Grafiği.....	50
4.1.2 Genistein Molekülüne Ait UV-Vis Spektrumu ve Kalibrasyon Grafiği.....	51
4.2 Temozolomid/Genistein Yüklü Nanopartiküllerin Sentezi.....	52
4.3 Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Etken Madde Yüklenme Verimi.....	54
4.3.1 Reaksiyon Verimi.....	55
4.3.2 Enkapsülasyon Etkinliği.....	55
4.3.3 Etken Madde Yüklenme Verimi.....	56
4.4 Temozolomid/Genistein Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	57
4.4.1 Nanopartiküllerin Boyut Analizi ve Çoklu Dağılım İndeksleri.....	57
4.4.2 Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Analizi.....	60
4.4.3 Nanopartiküllerin Morfolojik İncelemesi.....	62
4.4.4 Nanopartiküllerin FT-IR Analizi.....	63
4.5 Nanopartiküllerin In Vitro Salım Analizi.....	65
4.6 U87MG İnsan Glioblastoma Hücre Hattında Temozolomid ve Genistein Yüklü nanopartiküllerin In Vitro Aktiviteleri.....	67
4.6.1 Temozolomid ve Genistein Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi.....	68

4.6.2 Temozolomid-Genistein U87MG Hücreleri Üzerindeki Kombinasyon indeksinin hesaplanması.....	74
4.6.3 Temozolomid-Genistein Kombinasyonu ve Temozolomid-Genistein NP'lerin U87MG Hücreleri Üzerindeki Hücre Göçü Etkisi.....	75
4.6.4 Temozolomid-Genistein Ve Temozolomid-Genistein NP'lerin U87MG Hücreleri Üzerindeki Anti-Proliferatif Etkisi.....	77
4.6.5 Temozolomid-Genistein Ve Temozolomid-Genistein NP'lerin U87MG Hücreleri Üzerinde Apoptoz İndüksiyonun Gen Düzeyinde Gösterimi.....	79
4.6.6 Temozolomid-Genistein Ve Temozolomid-Genistein NP'lerin U87MG Hücreleri Üzerindeki Apoptoz İndüksiyonunun Protein Düzeyinde Gösterimi	81
<b>5 SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>84</b>
<b>KAYNAKÇA</b>	<b>88</b>
<b>TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR</b>	<b>101</b>

## SİMGE LİSTESİ

---

A	Amper
rpm	Dakikada Dönme Hızı
°C	Derece Santigrat
g	Gram
Gy	Gray
L	Litre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mV	Milivolt
M	Molar
nm	Nanometre
cm	Santimetre
W	Watt
%	Yüzde

## KISALTMA LİSTESİ

---

ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Attenuated Total Reflectance
BF	Büyüme Faktörü
BrdU	5-Bromo-2-Deoksiüridin
BSA	Bovine serum albumin
DCM	Diklorometan
DL	Etken Madde Yüklenme Verimi
DMEM	Dulbecco's Medified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Fourier Transform Infrared
GA	Glikolik asit
GBM	Glioblastoma Multiforme
GDP	Guanozin difosfat
Gen	Genistein
GenNP	Genistein Nanopartikül
GTP	Guanosin-5'-trifosfat
HCl	Hidroklorik asit
IC <sub>50</sub>	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
KBB	Kan-Beyin Bariyeri
LA	Laktik asit
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NaCl	Sodyüm Klorür
NaOH	Sodyüm Hidroksit

NP	Nanopartikül
OD	Optik Yoğunluk
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDI	Çoklu Dağılım İndeksi
PGA	Poliglikolik asit
PIP3	Fosfatidilinositol (3-5)-trisfosfat
PKC	Protein kinaz C
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asit
Ppi	Proteaz fosfotaz inhibitörü
PTEN	Protein Tirozin Fosfataz ve Tensin Homoloğu
PTK	Tirozin kinaz
PVA	Polivinil alkol
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT	Radyasyon Tedavisi
RV	Reaksiyon Verimi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Tmz	Temozolomid
Tmz/Gen	Temozolomid/Genistein
TmzGenNP	Temozolomid Genistein Nanopartikül
TmzNP	Temozolomid Nanopartikül
UV	Ultra Violet

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1	Kanser hücrelerinin altı karakteristik özelliği .....	4
Şekil 2. 2	Temozolomidin kimyasal yapısı .....	11
Şekil 2. 3	Genistein kimyasal yapısı .....	14
Şekil 2. 4	İlaç taşıyıcı sistemler (A) Misel (B) Lipozom (C) Polimerik nanopartikül (D) Dendrimer (E) Karbon nanotüp (F) Metalik nanopartikül .....	18
Şekil 2. 5	(A) PLGA yapısı (B) PLA yapısı (C) PGA yapısı .....	22
Şekil 4. 1	Temozolomid molekülüne ait UV-Vis Spektrumu .....	50
Şekil 4. 2	Temozolomid molekülüne ait kalibrasyon eğrisi .....	51
Şekil 4. 3	Genistein molekülüne ait UV-Vis Spektrumu.....	52
Şekil 4. 4	Genistein molekülüne ait kalibrasyon eğrisi .....	52
Şekil 4. 5	GenNP ait boyut dağılım analizi.....	58
Şekil 4. 6	TmzNP1 ait boyut dağılım analizi .....	58
Şekil 4. 7	TmzNP2 ait boyut dağılım analizi .....	59
Şekil 4. 8	TmzGenNP ait boyut dağılım analizi .....	59
Şekil 4. 9	GenNP'ye ait zeta potansiyel grafiği .....	60
Şekil 4. 10	TmzNP1'e ait zeta potansiyel grafiği .....	61
Şekil 4. 11	TmzNP2'ye ait zeta potansiyel grafiği.....	61
Şekil 4. 12	TmzGenNP'ye ait zeta potansiyel grafiği .....	62
Şekil 4. 13	TmzGenNP'nin 20.000x büyütme oranı ile çekilmiş SEM görüntüsü	63
Şekil 4. 14	Temozolomid, Genistein, PLGA TmzNP, GenNP ve TmzGenNP'ye ait FT-IR spektrumları.....	65
Şekil 4. 15	TmzGenNP'nin temozolomid ve genistein için in vitro salım grafiği .	67
Şekil 4. 16	U87MG insan glioblastoma hücrelerinin A)10X ve B)40X mikroskop görüntüleri.....	67
Şekil 4. 17	Genisteinin U87MG hücre canlılığına 24 ve 48 saat süre ile etkisi....	69
Şekil 4. 18	Temozolomidin U87MG hücre canlılığına 24, 48 ve 72 saat süre ile etkisi.....	70
Şekil 4. 19	Temozolomid-genistein kombinasyonunun U87MG hücre canlılığına 24 ve 48 saat süre ile etkisi.....	71
Şekil 4. 20	Temozolomid nanopartikülünün (TmzNP) U87MG hücre canlılığına 24 ve 48 saat süre ile etkisi.....	72

<b>Şekil 4. 21</b>	Genistein nanopartikülünün U87MG hücre canlılığına 24 ve 48 saat süre ile etkisi.....	73
<b>Şekil 4. 22</b>	Temozolomid-genistein nanopartikülünün U87MG hücre canlılığına 24 ve 48 saat süre ile etkisi .....	74
<b>Şekil 4. 23</b>	Temozolomid ve genisteinin kombinasyon indeksi eğrisi .....	75
<b>Şekil 4. 24</b>	Tmz/Gen ve TmzGenNP'nin U87MG hücrelerinde yara kapanmasına etkisinin yüzdesel gösterimi .....	77
<b>Şekil 4. 25</b>	Tmz/Gen ve TmzGenNP'nin U87MG hücre göçüne etkisi.....	77
<b>Şekil 4. 26</b>	Tmz/Gen ve TmzGenNP'nin U87MG hücre proliferasyonuna etkisi .	79
<b>Şekil 4. 27</b>	Sitokrom-c (Cyt-c), Bcl-2, Bax, kaspaz-3 (Cas-3), kaspaz-9 (Cas-9), kaspaz-8 (Cas-8) genlerinin kontrole göre relatif ekspresyonları .....	81
<b>Şekil 4. 28</b>	Tmz/Gen ve TmzGenNP uygulanan U87MG hücrelerinde siktokrom-c (Cyt-c), Kaspaz-9 (Cas-9), Kaspaz-3 (Cas-3) ve B-aktin proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin Western Blot ile gösterimi .....	83

## TABLO LİSTESİ

---

<b>Tablo 2. 1</b> Flavonoidlerin alt grupları, ana kaynakları ve örnek flavonoidler .....	12
<b>Tablo 2. 2</b> Genistein özellikleri .....	15
<b>Tablo 3. 1</b> İnsan glioblastoma hücre hattının özellikleri .....	37
<b>Tablo 3. 2</b> cDNA sentez bileşenleri.....	42
<b>Tablo 3. 3</b> cDNA sentez reaksiyon protokolü .....	43
<b>Tablo 3. 4</b> qRT-PCR analizinde kullanılan bileşenler ve miktarları.....	43
<b>Tablo 3. 5</b> qRT-PCR reaksiyon koşulları.....	44
<b>Tablo 3.6</b> qRT-PCR ile amplifikasyonu gerçekleştirilecek genlere ait oligonükleotid dizileri, ürün uzunluğu ve Tm değerleri.....	45
<b>Tablo 3. 7</b> Protein standartlarının hazırlanması .....	47
<b>Tablo 4. 1</b> Nanopartikül optimizasyon parametreleri.....	54
<b>Tablo 4.2</b> Üretilen nanopartiküllerin fiziko-kimyasal karakterizasyon sonuçları	54



## **Temozolomid ve Genistein Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Anti-Proliferatif ve Apoptotik Etkilerinin İnsan Glioblastoma Hücrelerinde Karşılaştırmalı Analizi**

İrem METEOĞLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ

Glioblastoma multiforme (GBM), en yaygın ve agresif beyin kanser türlerinden biridir. GBM'nin yüksek düzeyde invaziv doğası ve kan-beyin bariyeri (KBB) gibi fizyolojik engellerden ilaç penetrasyonunun zorluğu GBM tedavisini zorlaştırmaktadır. Temozolomid (Tmz), GBM tedavisinde kullanılan standart kemoterapi ajanıdır. Ancak, KBB ve tümör hücre zarlarından düşük geçirgenlik, Tmz'nin farmakolojik aktivitesini ve biyoyararlanımını azaltmaktadır. Daha etkin glioblastoma tedavisi için kemoterapi duyarlılığını arttıracak ve yan etkileri azaltacak yeni stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

İnsan diyetindeki en büyük izoflavon olan genistein (Gen) hücre bölünmesi kontrolü, apoptotik hücre ölümü, hücre göçü, invazyon, anjiyogenez ve metastaz gibi hücresel olayları kontrol eden potansiyel bir kemoterapötik ajandır. Ancak bu molekülün anti-kanser ajan olarak kullanımı suda düşük çözünürlüğü sebebiyle sınırlıdır. Nano-ilaç taşıma sistemleri, hem temozolomid hem de genisteinin dezavantajlarının üstesinden gelmek ve biyolojik aktivitelerini geliştirmek için kullanılabilecek önemli araçlardır.

Bu tez çalışmasında, Gen ve Tmz yüklü PLGA nanopartikül sistemlerinin (TmzGenNP) üretimi, karakterizasyonu ve U87MG glioblastoma hücreleri üzerindeki anti-tümör aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla temozolomid ve genistein yüklü PLGA nanopartiküller tekli emülsiyon (o/w) çözücü uçurma yöntemi ile sentezlenmiştir. Nanopartiküllerin fizikokimyasal karakterizasyonu, nanopartiküllerin küçük boyutlu, uniform ve kontrollü salım özelliklerine sahip olduğunu ortaya koymuştur. TmzGenNP'nin U87MG glioblastoma hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri MTT yöntemi ile belirlenmiştir. U87MG hücrelerinin Tmz/Gen kombinasyonu ve TmzGenNP ile 24 saat inkübasyonu sonrası IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 15.29 µg/ml ve 16.72 µg/ml, 48 saat inkübasyonu sonrası IC<sub>50</sub> değerleri ise 71.48 µg/ml ve 3.43 µg/ml olarak belirlenmiştir. Yara iyileşme testi ile TmzGenNP'nin U87MG hücre göçünü önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir. BrdU inkorporasyon analizi, TmzGenNP'nin U87MG hücre proliferasyonunu doza bağımlı olarak azalttığını ortaya koymuştur. TmzGenNP'nin apoptotik genlerin ekspresyonunu arttırdığı kantitatif real-time PCR analizi ile gösterilmiştir. Ayrıca, TmzGenNP'nin U87MG hücrelerinde intrinsik apoptozu indüklediği immunoblot analizi ile tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular, TmzGenNP'nin U87MG hücrelerinde gelişmiş anti-tümör aktivitesi sergilediğini ve ikili nano-ilaç dağıtımının glioblastomaya karşı umut verici bir strateji olabileceğini göstermiştir.

**Kelimeler:** Glioblastoma, temozolomid, genistein, nanopartikül, anti-tümör aktivite

# Comparative Analysis Of Antiproliferative and Apoptotic Effects of Temozolomide and Genistein Loaded Polymeric Nanoparticles in Human Glioblastoma Cells

İrem METEOĞLU

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most common and aggressive types of brain cancer. The highly invasive nature of GBM and the difficulty of drug penetration from physiological barriers such as the blood-brain barrier (BBB) make GBM treatment difficult. Temozolomide (Tmz) is the standard chemotherapy agent used in the treatment of GBM. However, low permeability through BBB and tumor cell membranes reduces the pharmacological activity and bioavailability of Tmz. For more effective glioblastoma treatment, new strategies are needed to increase chemotherapy sensitivity and reduce side effects.

Genistein (Gen), the largest isoflavone in the human diet, is a potential chemotherapeutic agent that controls cellular events such as cell division control, apoptotic cell death, cell migration, invasion, angiogenesis, and metastasis. However, the use of this molecule as an anti-cancer agent is limited due to its low solubility in water. Nano-drug delivery systems are important tools that can be used to overcome the disadvantages of both temozolomide and genistein and improve their biological activity.

In this thesis, it is aimed to produce and characterize Gen and Tmz loaded PLGA nanoparticle systems (TmzGenNP) and to evaluate their anti-tumor activities on U87MG glioblastoma cells. For this purpose, temozolomide and genistein-loaded PLGA nanoparticles were synthesized by a single emulsion (o/w) solvent evaporation method. Physicochemical characterization of nanoparticles revealed that nanoparticles have a small size, uniform, and controlled release properties. The cytotoxic activities of TmzGenNP on U87MG glioblastoma cells were determined by the MTT method. After 24 hours incubation of U87MG cells with Tmz/Gen combination and TmzGenNP, IC<sub>50</sub> values were determined as 15.29 µg/ml and 16.72 µg/ml, respectively and after 48 hours of incubation, IC<sub>50</sub> values were determined as 71.48 µg/ml and 3.43 µg/ml, respectively. With the wound healing assay, it has been shown that TmzGenNP significantly inhibited U87MG cell migration. BrdU incorporation analysis revealed that TmzGenNP decreased U87MG cell proliferation in a dose-dependent manner. Quantitative real-time PCR analysis has shown that TmzGenNP increases the expression of apoptotic genes. In addition, induction of intrinsic apoptosis in U87MG cells by TmzGenNP was determined by immunoblot analysis. Findings from this thesis showed that TmzGenNP exhibits enhanced anti-tumor activity in U87MG cells and dual nano-drug delivery can be a promising strategy against glioblastoma.

**Keywords:** Glioblastoma, temozolomide, genistein, nanoparticle, anti-tumor activity

### 1.1 Literatür Özeti

Kanser, dünyada ölüme neden olan hastalıkların başında gelmektedir [1]. Kötu huylu gliomalar, yetişkinlerde en sık görülen birincil beyin tümörlerini oluşturur ve kötu prognozları nedeniyle en yıkıcı ve agresif insan kanseri türleri arasında yer alır. Glioblastoma'ya (GBM) bağlı kötu prognozun nedenleri biri nadir görülen sistematik metastaza rağmen, tümör hücreleri çevredeki beyin dokusuna sızır, cerrahi rezeksiyon sınırlıdır. Ayrıca kan-beyin bariyerinin (KBB) beyin tümörleri için uygun kemoterapi ilaçlarının önünde bir engel olarak rolü vardır. Hedeflerine ulaşmak için sadece küçük moleküllerin KBB'ye girmesine izin verilir. Bir diğer neden ise, GBM birçok sitotoksik ilaca dirençlidir [2].

Temozolomid, GBM tedavisinde en sık kullanılan kemoterapötik ajan olup yüksek bir KBB geçirgenliğine sahiptir. Buna karşın hastalığın ilaca direnç göstermesi sebebiyle primer tümör sıklıkla yeniden ortaya çıkar ve bulantı, kusma, iştahsızlık vb. yan etkiler ilacın klinik kullanımını sınırlamaktadır [3].

Flavonoidler, bitkilerin hemen hemen tüm büyüyen kısımlarında bulunan, klorofil ve karotenoidlerle birlikte en bol bitki pigmenti olarak bilinen, aynı zamanda meyvelere, çiçeklere ve tohumlara koku ve tat veren, bitkilerin hemen hemen her yerinde bulunan değişken yapılara sahip büyük bir doğal maddeler grubudur. Flavonoidler, bitkilerle olan ilgilerinin yanı sıra, yüksek farmakolojik aktiviteleri nedeniyle insan sağlığı için önemli bileşiklerdir. Bu bileşikler, kanser, antiviral, inflamasyon, kardiyovasküler ve nörodejeneratif bozukluklar gibi birçok kronik hastalığa karşı kullanılan başlıca biyoaktif bileşiklerdir; Aktif diyet bileşenlerinin meyve ve sebzelerde bulunan antioksidan besinler olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir [4]. Flavonoidler; Flavanoller, flavanonoller, flavanonlar, flavonlar, flavonoller, isoflavonlar, antiosiyantinler olmak üzere 7 alt gruba ayrılırlar.

İzoflavonoid grubunun üyesi olan genistein, soya ürünlerinde bol miktarda bulunan bir flavonoid sınıfı olan izoflavondur ve çeşitli kanserlere karşı güçlü bir antikanser aktivite gösterir. Bilimsel raporlar, genisteinin, hücre döngüsü ve apoptoz düzenleyici moleküllerin ekspresyonunu modüle ederek tümör büyümesini engellediğini ileri sürmektedir [5]. Bu özelliklerinin yanı sıra genisteinin farmakolojik kullanımı, zayıf suda çözünürlüğü ve düşük biyoyararlanımı nedeniyle sınırlıdır [6].

Nanopartiküller (NP); biyouyumlulukları, yüksek etken madde yükleme kapasiteleri, kimyasal stabiliteleri ve basit sentez-yüzey işlevselleştirmeleri sayesinde umut verici anti-kanser ilaç nanotaşıyıcıları olarak yaygın şekilde uygulanmaktadır [7]. Polimerik nanopartiküller, terapötik bileşiklerin nanopartikülün çekirdeği içinde hapsedildiğinden, üretim koşullarını kontrol etmek, belirli polimer türlerini seçmek, fizikokimyasal özelliklerin (boyut, hidrofobiklik, yüzey yükü) ve ilaç salım parametrelerinin (hızlı, kontrollü, sürekli) ayarlanmasına izin vererek tasarım esnekliğine izin verir [8, 9]. PLGA nanopartikül üretimi için en sık tercih edilen biyopolimer olup, nano-boyutlarda üretimi çeşitli bariyer ve kılcal damarlardan geçme, ayrıca hedef dokularına ulaşana kadar vücudun farklı sistemlerinde dolaşma yeteneği vererek etkin ilaç dağıtımına olanak sağlar. Nanopartiküller, beyne ilaç iletimi için invazif olmayan bir tedavi yöntemi sunar. Bununla birlikte, boyut, salım kinetiği, kimyasal özellikler açısından optimize edilmeleri, KBB'yi geçme yeteneklerinin yanı sıra ilacı biyolojik ortamdan korumak ve ilaç çözünürlüğünü arttırmasından dolayı tercih edilmektedir [10].

## **1.2 Tezin Amacı**

Bu tez çalışmasının amacı, daha etkin bir glioblastoma tedavisi sağlamak amacıyla temozolomid ve genistein yüklü nanopartiküler sistemler geliştirmek ve anti-kanser aktivitesini U87MG glioblastoma hücreleri üzerinde belirlemektir. Bu amaçla, genistein yüklü, temozolomid yüklü ve genistein-temozolomid yüklü PLGA nanopartiküller üretildi ve karakterize edildi. Üretilen nanopartiküllerin U87MG hücreleri üzerindeki anti-kanser aktiviteleri serbest moleküller ile karşılaştırmalı

olarak hücresele ve moleküler düzeyde belirlenmiştir. Genistein ve temozolomid yüklü nanopartiküllerin U87MG hücreleri üzerindeki anti-kanser etkisi, sitotoksik, anti-proliferatif, apoptotik ve anti-migrasyon özelliklerinin belirlenmesiyle ortaya konulmuştur.

### **1.3 Hipotez**

Flavonoidlerin nano ilaç taşıyıcı sistemler içinde kemoterapötik ilaçlar ile kombinasyonu sonucu anti-kanser etkinliğinin gösterilmesi hem yeni kombinasyon tedavilerin geliştirilmesi sürecine katkı sağlayacak olup hem de kemoterapötik ilaçların sahip olduğu dezavantajlı özellikleri ortadan kaldırmaya olanak tanıyacaktır. Daha önce insan glioblastoma hücre hattında temozolomid ve genistein yüklü nanopartiküler formülasyonların anti-kanser aktivitesi çalışılmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasından elde edilen verilerin nano temelli biyoteknolojik ilaç sistemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayıcı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca üretilecek temozolomid ve genistein nanopartiküler formülasyonunun glioblastoma hücrelerini inhibe edici aktivitesinin altında yatan başlıca moleküler mekanizmaların anlaşılması farklı kanser hücre hatlarında kombinasyon terapilerinin geliştirilmesine, dolayısıyla yeni biyoteknolojik ilaçların üretilmesine olanak sağlayacaktır.

## 2.1 Kanser ve Hücre Döngüsü

Kanser, yılda 10 milyondan fazla insanın ölümüne neden olan en yaygın ölümcül hastalıklardan biridir [11]. Çeşitli tedavi stratejileri, 100'den fazla kanser türü için geliştirilmiştir [12]. İnsanlarda kanser oluşumu, sağlıklı hücrelerin kötü huylu hücrelere dönüşümünü tetikleyen çeşitli genetik veya epigenetik değişikliklerden kaynaklanan mekanizmalarla gerçekleşmektedir [13]. Kanser hücrelerini karakterize etmeye yönelik çeşitli çalışmalar içinde en önemli karakterizasyonu, Hanahan ve Weinberg gerçekleştirmiştir [14]. Kanser hücresi fizyolojisinde altı ayırt edici özelliğini Şekil 2.1'de verildiği gibi tanımlamışlardır. Bunlar; sınırsız replikasyon potansiyeli, büyüme faktörlerine ihtiyaç duymadan kendi kendine yeterlilik, programlanmış hücre ölümünden kaçma, büyüme baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, sürekli anjiyogenez ve doku invazyonuyla metastazı içermektedir [15].



Şekil 2. 1 Kanser hücrelerinin altı karakteristik özelliği [15]



Kanser hücresinde, DNA onarımında, hücre döngüsü kontrol noktalarında edinilmiş veya kalıtsal kusurlar bulunur [16].

Hücre döngüsü, hücrenin çoğalmasını ve bölünmesini sağlayan başlıca DNA replikasyonu ve replike edilmiş kromozomların iki ayrı özdeş hücreye aktarılmasından oluşan bir süreçtir. Bu süreç, DNA'nın replikasyonunun gerçekleştiği sentez (S) fazı ve mitoz (M) veya diğer adıyla nükleer bölünme süreci olan kromozomun ayrıldığı ve hücrenin bölündüğü evredir [17]. S fazından önce, hücrenin DNA sentezi için hazırlandığı G1 adı verilen, ara fazlardan biri yer almaktadır. Diğer ise G2 fazı olarak adlandırılan, hücrenin mitozla hazırlandığı ara fazdır. G1, S, G2 ve M fazları standart hücre döngüsünü oluşturan dört fazdan oluşurlar. G1 fazındaki hücreler, DNA replikasyonuna bağlanmadan önce G0 adı verilen bir dinlenme durumuna girebilir. Bölünmeye hazır olmayan hücrelerin, insan vücudundaki büyümeyen, çoğalmayan hücrelerin büyük bir bölümünü G0 fazını oluşturur [18]. Hücrenin büyümesi ve bölünmesi için uygun koşullar sağlandığında, G0 fazından G1 fazına geçerek hücre döngüsüne başlar [19].

G1 ve G2 ara fazları hücre bölünmesi için gerekli olan hazırlığın yanı sıra hücrenin iç ve dış çevresindeki koşulların ve kontrollerin sağlandığı süreçlerdir. DNA'da oluşabilecek hasarların kontrol noktaları, hücrenin DNA replikasyonundan S fazına girmeden önce (G1-S kontrol noktası) veya DNA replikasyonundan sonra (G2-M kontrol noktası) bu noktalarda tespit edilir. Diğer bir kontrol noktası ise, kromozomların iğiplikçiklerine bağlanıp bağlanmamasını kontrol eden Mitoz (M) fazında metafaz-anafaz geçişinde tespit edilir [20].

Hücrelerde kontrol sürecinde bazı temel proteinler rol oynar. Bunlar; siklinler, siklin bağımlı kinazlar (Cdk) ve düzenleyici proteinler olarak ayrılırlar ve G0, G1, S, G2 ve M fazları arasında düzenlemeyi sağlarlar. Cdk'lar hücre döngüsünde, G1 fazında (Cdk4, Cdk6), G2 ve S fazlarında (Cdk2), M fazı (Cdk1) sırasında aktive edildiklerinde regülatör proteinlerdir. Siklinler, Cdk'lar ile bağlanarak proteinlerin bölgelerine özgü fosforilasyonu ve ubikutin aracılı bozunmalar akış aşağı süreçleri başlatırlar. Siklinlerin aksine CDK'ların hücre döngüsü boyunca protein seviyeleri

sabit kalır. Aktive edici protein olan siklinler, hücre döngüsü devam ederken yükselir veya düşer böylelikle CDK'ları aktive eder.

G1 fazı için D tipi siklin (siklin D1, siklin D2, siklin D3), Cdk4 ve Cdk6 bağlanarak retinoblastoma proteinin fosforilasyonu için başlatıcıdır. Siklin D/Cdk 4-Cdk6 kompleksi siklin E/Cdk 2 kompleksini aktive ederek G1 fazından S fazına geçişi düzenlemeye yarar [21]. S fazına geçildiğinde ise Cdk2 siklin A ile bağlanarak kromozom replikasyonunun uyarılmasında yardımcı olur. Ayrıca A tipi siklin Cdk1 ile kompleks oluşturur. Bu da G2 fazından M fazına geçişini sağlar. Cdk1, B tipi siklin tarafından M fazında hücre döngüsünü düzenler. Siklin B (siklinB1, siklinB2, siklinB3) mitoz süreci boyunca esansiyel proteinleri olup hücrenin farklı bölgelerinde yerleşmiştir. Siklin bağlanmalarında belirli seviyeye ulaştığında, Cdk aktivitesi treonin ve tirozin rezidülerinin fosforlanması ve defosforlanması ile kontrol edilir [22]. Cdk aktivitesi, Cdk aktive edici kinazlar (CAK) ve Cdk aktivitesini düzenleyen Cdk inhibitörleri (CKI) tarafından hücre döngüsü dengelenebilir. Cdk inhibitörleri INK4 ve Cip/Kip ailesi proteinleri olarak ayrılırlar. INK4 proteinleri, Cdk4 veya Cdk6 ile katalitik alt gruplarına bağlanarak inaktive eden p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c), p19 (INK4d) ailesinin proteinlerindedir. Bu protein, Cdk4 ile Cdk6 bağlanarak D tipi sikline bağlanmasını önler [23]. Diğer inhibitör ailesi olan Cip/Kip ise, siklin E, siklin D, siklin A bağımlı kinaz proteinlerin aktiviteleriyle ilgilidir. p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2), p57 (Kip2) proteinleri bu ailenin üyeleridir. Cip/Kip amino uçları, siklin ve Cdk kompleksinin bağlanma motiflerini içererek etkisiz hale getirir [24].

Hücre döngüsünü kontrol eden diğer proteinlerden, tümör baskılayıcı protein olan p53'ün regülasyonu hücre döngüsünün durdurulmasına neden olur. P21 sentezi, p53 aktivasyonu ile artış gösterir ve p21, siklin E/cdk2 ile siklin D/cdk4 komplekslerine bağlanarak G1 fazını durdurur. Bununla birlikte p21 artan hücre çekirdek antijenine (PCNA) bağlanarak inhibe eder ve DNA sentezini de engeller. Diğer sinyal yollarından, NF- $\kappa$ B aktivitesi artarak D tipi siklin protein transkripsiyonel aktivasyonu ile hücre döngüsünde tetiklenir. PI3K/Akt sinyal yolağı ise hücre döngüsünün G1/S fazının aktifleşmesinde, hücrenin proliferasyonun da rol oynar [25, 26].

## 2.2 Glioblastoma

Glioblastoma multiforme (GBM) yetişkinlerde ve çocuklarda en sık görülen ölümcül primer beyin tümörü olup toplumun %0.02'sini etkilemektedir. Beyin tümörleri, birincil veya metastatik tümörler olarak kategorize edilir.

Metastatik tümörler, merkezi sinir sistemi (MSS) dışından kaynaklanan ve daha sonra MSS'ye yayılan tümördür. MSS'ye metastaz yapan en yaygın olan diğer kanserler meme, mesane, akciğer, böbrek, lenfoma ve melanomdur. Öte yandan, birincil tümörler MSS'den kaynaklanır ayrıca çok sayıda yaygın ve nadir tipleri vardır. Yaygın olan tipleri gliomlar, menenjiyomlar ve schwannomlardır. Menenjiyomlar meninkslerden, omuriliği ve beyni çevreleyen zardan kaynaklanırken, schwannomalar yardımcı schwann hücrelerinden kaynaklı tümörlerdir. Tüm malign primer beyin tümörlerinin % 77'sini gliomlar oluştururlar [27, 28] .

Gliomalar, sınıflandırılan belirli glial hücrelerden kaynaklanan tümörlere verilen addır. Bunlar histolojik olarak astrositomların (astrositlerden köken alan), oligodendrogliomaların (oligodendrositlerden kaynaklanan) ve oligoastrositomların (astrosit ve oligodendrositlerin karışımı) 4 farklı evresi bulunur . Derece I glioma yavaş büyüme oranlarına ve düşük metastatik yeteneğe sahiptir. Oligodendrogliomalar ve oligoastrositomlar sırasıyla derece II ve derece III gliomalara olarak sınıflandırılır. Astrositomalar ayrıca pilositik (derece I), yaygın (derece II), anaplastik (derece III) ve glioblastoma multiforme (derece IV) olarak kategorize edilir [29].

GBM'nin bir ayırt edici özelliği, tümör kütesinin merkezinde nekrotik bölgelere sahip olmasıdır. GBM'nin diğer bir karakteristik fenotipi, artan proliferasyon hızı ve anjiyojenik aktiviteleridir. Bununla beraber ayırt edici özellikleri, beyin parankimine yaygın invazyon, kemoterapi ilaçlarına direnç, genomik dengesizlik ve apoptoza dirençtir.

Tümörün karmaşık yapısı, tedavi direncinin nedenlerinden biridir. Glioblastoma, morfolojiyi, proliferasyonu, gen ekspresyonunu ve hücrelerin ilaç yanıtını etkileyen heterojen tümör popülasyonlarını tanımlayan "multiforme"dir. Ayrıca bu

multiforme yapısı nekrotik ve hemorajik bölgelere neden olur. Bu bölgeler, pleomorfik hücreleri ve çekirdeği, mikrovasküler proliferasyonu ve psödopalizan nekrozu içerir. Ek olarak, GBM'nin multiforme yapısına, sinyal iletim yolunun hiper aktivasyonuna neden olan çeşitli nokta mutasyonları, delesyonları ve amplifikasyonları eşlik eder [30, 31] .

GBM'nin malign dönüşümü sırasında farklı sinyalleşme yolları değişikliğe uğratılır. Bu değiştirilmiş yolların en önemlisi, reseptör tirozin kinazlardır (RTK). RTK'ler, büyüme faktörleri (BF) bağlanmasından sonra aktive olan hücre yüzeyindedir. Epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR) sinyali, GBM'deki önemli RTK'lardan biridir. EGFR sinyalizasyon, her tür MSS hücrelerinde farklılaşma, proliferasyon ve göç dahil olmak üzere hayatta kalma fonksiyonlarını etkinleştirir. EGFR, GBM'lerde reseptörlerin mutasyonları, reseptör veya ligandın aşırı ekspresyonu veya EGFR lokusunun amplifikasyonu yoluyla yüksek düzeyde aktive edilebilir. Bu anormalliklerin bir sonucu olarak, EGFR yolu yapısal olarak aktive edilir [32, 33]. Ras, GBM'de başka bir yaygın değiştirilmiş yoldur. Ras, heterotrimerik G-proteinleri gibi ikili anahtarlar olarak düzenlenir. Guanozin difosfat (GDP) Ras'a bağlandığında, yol inaktif formdadır, daha sonra Guanosin-5'-trifosfat (GTP) bağlanması ile aktive edilir ve akış aşağı sinyal yayar. GTP'ye bağlı aktif Ras, hücre döngüsünü, göçü ve hayatta kalmayı sağlar. Ek olarak, Ras'ın hedeflerinden biri PI3K / Akt yoludur. PI3K / Akt (Fosfatidilinozitol-4,5-Bifosfat 3- Kinaz / Fosfataz / serin treonin kinaz Akt) yolu da büyüme faktörü reseptörleri tarafından aktive edilir. Akt, hücre proliferasyonuna, hayatta kalmaya ve apoptozun inhibisyonuna neden olarak aşağı yönde bir molekül olarak fosfatidilinositol (3-5)-trisfosfat (PIP3) tarafından aktive edilir. Öte yandan, PTEN (Protein Tirozin Fosfataz ve Tensin Homoloğu) normal koşullarda PI3K sinyal yolunu negatif olarak düzenler. Bununla birlikte, PTEN sıklıkla mutasyona uğrar ve GBM'de bir tümör baskılayıcı olarak çalışamaz. PTEN aktivitesi kaybı, kromozomal mutasyonlar, heterozigotluk kaybı, DNA metilasyonu yoluyla ifadenin susturulması veya PTEN ekspresyonunu baskılayan bazı microRNA'ların aşırı ekspresyonu nedeniyle sıklıkla gözlenir [34, 35].

### **2.2.1 Glioblastoma Tedavisi**

Yetişkinlerde, GBM sadece en yaygın birincil beyin tümörü değil, aynı zamanda en ölümcül olanıdır. Glioblastomada ortalama sağ kalım, tanı tarihinden itibaren bir yıldan az olmakla birlikte en ideal koşullarda bile çoğu hasta iki yıl içinde hayatını kaybetmektedir. Hastalığın standart tedavisi, cerrahi uygulamaları sonrası radyoterapi ve bazı durumlarda kemoterapi uygulanması şeklindedir [36].

#### **2.2.1.1 Cerrahi Tedavisi**

Cerrahi tedaviyi genellikle adjuvan tedavi olarak radyoterapi ve kemoterapi izler, ancak hepsi prognozu önemli ölçüde iyileştirmede başarısız olur [37]. Bunlar; birincisi, GBM, geleneksel tedavilere kolayca direnç kazanan heterojen bir tümördür. İkinci sorun ise kan-beyin bariyeridir [38]. Beyne zarar veren kan kılcal damarlarını oluşturan endotel hücreleri alışılmadık şekilde birbirlerine sıkıca temas eder. Bunun da ötesinde, endotel hücreleri, onları dışarıdan çevreleyen glial hücreler ve perisitler tarafından daha da güçlendirilir. Vücudun geri kalanına zarar veren diğer damarların aksine, bu damarlar moleküllerin çoğunun sızmasına izin vermez. Bu güvenlik kontrol noktası kan-beyin bariyeri (KBB) olarak adlandırılır ve varlığı beyin tümörlerine karşı yeni anti-kanser ilaçlarının keşfedilmesinin önündeki en büyük engeldir. Ayrıca, beynin sınırlı onarım kapasitesi tedavi seçeneklerini azaltır. KBB, iyonların ve 200 daltonun üzerindeki moleküllerin transferini gerçekleştirir. Bir molekülün intrakraniyal endotelial hücrelerden geçebilmesi için lipofilik özelliklere sahip olması ve serumda taşıyıcı proteinler içermemesi gerekir [39, 40].

#### **2.2.1.2 Radyoterapi Tedavisi**

Radyasyon tedavisi (RT), kanserli hücrelerin DNA'sını hedeflemek için yüksek frekansta hareket eden partiküller ve dalgalar kullanır. Radyoterapide temel amaç, tümör lezyonlarını büyük bir hassasiyetle, normal dokulara önemli ölçüde düşük hasar vererek tümör lezyonunu hedeflemektir. Tüm kanser hastalarının yaklaşık % 60'ı tedavi sırasında RT alır. RT, GBM ve diğer katı tümörlerin yönetiminde önemli bir yardımcı iken, tümörün ameliyat edilemediği bazı durumlarda, RT tek terapötik seçenektir.

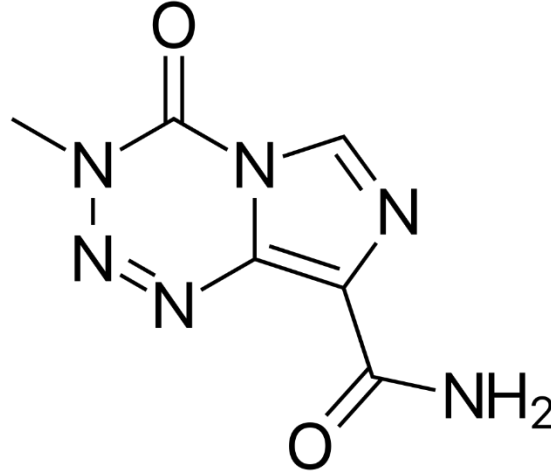
Radyasyon birimi, bir kilogram madde başına bir jul radyasyon enerjisinin absorpsiyonu olan Gray (Gy) olarak tanımlanır. RT tedavilerinde, 1 Gy'lik radyasyon dozu, hücre başına yaklaşık 3000 hasarlı taban, 1000 tek sarmal kırılması ve 40 çift sarmal kırılması oluşturur [41, 42].

Çeşitli kanser türlerinin RT'de, radyasyon dozu, tümörün konumuna ve ciddiyetine bağlı olarak, tipik olarak 45 ila 60 Gy arasında değişir ve altı hafta boyunca günde 1.8-2 Gy uygulanır. Kanserli hücrelerdeki genomik dengesizlikler daha sonra iki alternatif yolla üretilebilir; doğrudan ve dolaylı etkiler. Radyasyon ışınları doğrudan DNA ile etkileşime girebilir ve DNA hasarlarına neden olabilir veya hücrelerdeki su moleküllerinden Reaktif Oksijen Türleri (ROS) oluşturabilir ve oluşturulan ROS, DNA lezyonlarını ortaya çıkarabilir [43, 44].

### **2.2.1.3 Kemoterapi Tedavisi**

Kemoterapi, radyasyon tedavisi gibi diğer tedavilerle eş zamanlı olarak verilebilir. Klinik kullanımdaki standart kemoterapi ilacı hedefe yönelik tedaviyi sağlar. GBM tedavisi için altın standart kemoterapötik ajan temozolomidir [45]. Şekil 2.2'de temozolomidin kimyasal yapısı yer almaktadır. Temozolomid (Tmz) 2005 yılında FDA tarafından onaylanmış küçük, lipofilik bir DNA alkilleyicidir. Ayrıca bu kemoterapötik ajan MSS'ye etkin bir şekilde nüfuz eden ve tümöre lokalize olan yüksek bir KBB geçirgenliğine sahiptir [46]. Bir dizi modifiye edilmiş imidazotetrazinondan türetilmiştir, kimyasal olarak dakarbazin ile ilişkilidir ve deneysel antikanser ilaç mitozolomidin 3-metil türevidir. Tmz, DNA'da O6-metilguainin oluşturarak hücre ölümüne neden olur ve DNA replikasyonu sırasında timin ile yanlış eşleşmelerle sonuçlanır. Bu eksik çiftler, apoptoza yol açan çift sarmallı kırılmalara neden olur. Ayrıca Tmz, KBB'yi geçebilir, tümörlerin çekirdek bölgelerine çok daha fazla nüfuz edebilir [47]. Bununla birlikte, temozolomid tedavide en çok tercih edilen ilaç olmasına karşın hastalığın ilaca direnç göstermesi sebebiyle primer tümör sıklıkla yeniden ortaya çıkmaktadır. Bu tedavilerdeki son gelişmelere rağmen, terapiye dirençli bir durumda tümör nüksü çok yaygındır. Tümörün agresif fenotipi ve beynin karmaşık yapısı GBM hastalarında kötü prognoza yol açar [48, 49]. Ayrıca, bulantı, kusma, iştahsızlık,

ishal, deri döküntüsü, saç dökülmesi, yorgunluk, baş dönmesi, bulanık görme, uykusuzluk ve baş ağrısı gibi kaçınılmaz yan etkiler de bu ilacın klinik kullanımını sınırlamaktadır. Bu amaçla, GBM tedavisi için yeni tedavi seçenekleri gereklidir [3, 50].



Şekil 2. 2 Temozolomidin kimyasal yapısı

### 2.3 Flavonoidler

Flavonoidler, 4000'den fazla polifenolik moleküllerden oluşan günlük diyetle bulunan bitki kaynaklı bileşiklerdir. Bu bileşikler, ortak fenilbenzopiron yapısında olup (C6-C3-C6) merkezindeki piran halkasının doyumluk seviyesine ve açılma özelliklerine göre sınıflandırılır [51]. Flavonoidler; flavanoller, flavanonoller, flavanonlar, flavonlar, flavonoller, isoflavonlar, antiosiyantinler olmak üzere 7 alt gruba ayrılır [52]. Bu alt gruplar Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Flavonoid grubunun diğer bir üyesi olan izoflavonlar çoğunlukla antioksidan özelliğe sahip olan polifenolik bileşiklerdir. İzoflavonlar, *Leguminosae* ailesinin üyelerinde bulunur. İzoflavonların temel kimyasal yapısı; heterosiklik piran halkasına bağlı 2 benzen halkasından oluşan flavon çekirdeğinden meydana gelmektedir. Hidroksil gruplarının varlığı ve pozisyonunun (özellikle  $\beta$  halkasında yer alanların) antioksidan aktivitede önemli olduğu, en etkili aktivitenin de 4 veya 6 hidroksil grubu içeren kimyasallarda görüldüğü belirlenmiştir [53].

İzoflavonoidler; daidzein, genistein, O-desmethylangolensin ve equol'ün olarak dört gruba ayrılırlar. İzoflavonların, karsinojenezde yer alan oksidanları temizleme yetenekleriyle antikanser ajanlar olarak görev alırlar. İzoflavonların serbest radikal oluşumunu inhibe ettiği, lipid oksidasyonunu azalttığı ve antioksidan enzimleri uyardığı tespit edilmiştir [54].

Flavonoidler, antioksidan, antimutajenik ve antiproliferatif özelliklere sahip bitki kökenli sebze, meyve ve içeceklerin içerisinde bulunur. Farklı tümörlere ait hücre hatları kullanılarak yapılan çok çeşitli in-vitro çalışmalarda flavonoidlerin hücre proliferasyonunu modüle ettiği, apoptozu kendi başına tetiklediği ve apoptoz indüksiyonunu kemoterapötik olarak kuvvetlendirdiği gösterilmiştir [55, 56]. Ayrıca in-vitro ve in-situ KBB çalışmalarında, flavonoidlerin yapısına bağlı olarak farklı flavonoidler için geçirgenlikte KBB'yi geçebildiği deneysel olarak kanıtlanmıştır. Flavonoidler, protein gibi sinyal iletim enzimlerini inhibe etmektedir [57, 58]. Tirozin kinaz (PTK), protein kinaz C (PKC) ve Fosfoinositid3-kinazlar (PIP3) etki ederek hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır [59].

**Tablo 2. 1** Flavonoidlerin alt grupları, ana kaynakları ve örnek flavonoidler [60]

Flavonoid alt-grupları	Örnek flavonoidler	Ana besin kaynakları
Flavonol	Kuarsetin, Kamferol, Mirisetin	Soğan, kiraz, elma, brokoli, lahana, domates, çilek
Flavon	Apigenin, Luteolin	Maydanoz, kekik
İzoflavon	Genistein, Daidzein	Soya unu, soya fasulyesi, süt
Flavanon	Hesperitin, Naringenin, Eriodiktol	Portakal, greyfurt
Antosiyanidin	Siyanidin, Malvidin, Petuidin	Patlıcan, böğürtlen, yaban mersini
Flavon-3-oller	Kateşin, Epigallokateşin, Epigallokateşin gallat	Çikolata, yeşil ve siyah çay, fasulyeler, kiraz, çilek, kakao



### 2.3.1 Kanserde Flavonoidler

Flavonoidlerin, tümör hücreleri üzerine etkisi ve istilasını önleyen mekanizmalarına sahip olduğu bulunmuştur [61]. Çilek, yeşil çay ve siyah çay içerisinde bulunan bir flavonoid türü olan kateşin, brüksel lahanasında ve elmada bulunan kaempferol, soğan ve elmada quercetin gibi diyetleri tüken insanların kanser riskini en aza indirdiği öne sürülmüştür [62].

Kanserin diyetle önlenmesine yönelik diğer çalışmalarda, meme ve kolon kanseri modelleri, flavonoidler ve izoflavonoidler dikkat çekmektedir. Portakal ve greyfurttan elde edilen hesperetin, turunçgil olmayan kaynaklardan elde edilen baicalein, galangin, genistein ve quercetin'in insan meme karsinomu hücre hattı olan MDA-MB-435 üzerindeki etkisi çalışılmıştır. Kültürde hücre proliferasyonunun inhibisyonunu değerlendirildiğinde tüm flavonoidler düşük sitotoksosite ve anti tümör aktivite göstermiştir [63].

Flavonoidler, antikarsinojenik etkilerinden proliferasyon, enflamasyon, anjiyogenez ve metastaz gibi kanser süreçlerine müdahale ettikleri bilinmektedir [64].

Apoptoz, bir dizi sinyal iletim kaskadları ve hücrel proteinler tarafından düzenlenen sıkı bir şekilde organize edilmiş bir süreçtir. Flavonoidler, transkripsiyon faktörlerini (örneğin, NF-kB, AP-1, STAT3), anti-apoptotik proteinleri (örneğin, Akt, Bcl-2, Bcl-XL), proapoptotik proteinleri (örneğin, kaspazlar, PARP) düzenleyerek apoptozu indükleyebilir. Flavonoidler çeşitlerinden apigenin, luteolin, quercetin ve genisteinin, p53 bağlı mekanizma ile hücre döngüsünün durmasına ve apoptoza neden oldukları bulunmuştur [56, 65].

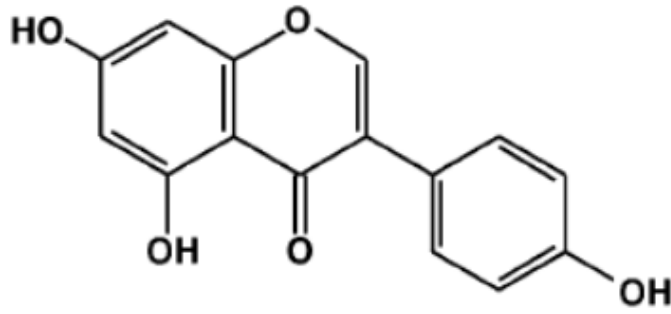
Bu kanserojenlerin, protein kinazlar (örn., IKK, EGFR, HER2, JNK, MAPK), hücre döngüsü proteinleri (örn., siklinler, sikline bağımlı kinazlar), hücre yapışma molekülleri, COX-2 ve büyüme faktörü sinyal yolları üzerine de etkisi olduğu bilinmektedir [66].

Flavonoidler, MMP ve uPA gibi genler üzerinde ekspresyonlarına etkisi olduğu görülmüştür [67]. Bu özellikle kanser hücrelerinin anjiyogenezi ve invazif

büyümesini teşvik eder [68]. Kanser hücrelerinin göçü ve invazyonun PI3K / AKT / mTOR ve MAPK yollarının dahil edildiği TGF- $\beta$ 1 kaynaklı EMT'yi inhibe eder [64].

### 2.3.2 Genistein

Genistein (4', 5, 7-trihidroksiizoflavon) insan diyetindeki en büyük izoflavon olup, en çok soya ve soya içeren ürünlerinde bulunmaktadır [69]. Genistein içerdiği gösterilen diğer bitkisel besinler; yonca ve yonca filizi, arpa unu, brokoli, karnabahar ve ayçiçeği, kimyon ve yonca tohumlarından oluşur [70]. 1899'da genistein ilk kez, Boyacı katırtırnağı olarak bilinen *Genista tinctoria*'dan ekstrakte edilmiş, böylece madde adını bu bitkiden almıştır [71]. Genisteinin kimyasal yapısı Şekil 2.3'de ve kimyasal özellikleri Tablo 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 3 Genistein kimyasal yapısı

**Tablo 2. 2** Genistein özellikleri [72]

<b>Molekülün adı</b>	Genistein
<b>Ağırlık</b>	270.24
<b>Moleküler formülü</b>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
<b>Mp</b>	297–298 °C
<b>Depolama Sıcaklığı</b>	20 °C
<b>Çözünürlük</b>	DMSO'da çözünür
<b>Form</b>	Toz
<b>Renk</b>	Kirli Beyaz
<b>Suda Çözünürlük</b>	Çözünmez
<b>Kararlılık</b>	Işığa Duyarlı

Epidemiyolojik çalışmalarla diyet ve kanser prevalansı arasında önemli bir ilişki olduğunu tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda, özellikle soya ürünlerince zengin diyetin tercih edildiği Doğu Asya ülkelerinde kanser prevalansının düşük olmasında soya ürünlerinde bulunan genisteinin katkısı bulunduğu düşünülmektedir [73]. Genistein farklı kanser tiplerinde temel olarak hücre bölünmesi kontrolü, apoptotik hücre ölümü, hücre göçü, invazyonu, anjiyogenezi ve metastazı gibi hücresel olayları kontrol eden potansiyel kemoterapötik bir ajandır. Genistein; androjenlerin östrojene dönüşümünü sağlayan enzimlerin, tirozin protein kinazların, sitokrom p450 enzimlerinin ve COX-2'nin inhibisyonuna neden olarak hücre fonksiyonlarına etki ettiği tespit edilmiştir [74].

Östrojene yapısal benzerliğinden dolayı genistein, östrojenik reseptörleri bağlama yeteneğine sahiptir. Bu nedenle hücre çoğalmasını düzenleyebilir, kanser hücrelerinin hormona bağlı büyümesini önleyebilir, hücreyi G2 / M fazında durdurarak hücre döngüsü inhibisyonu, tirozin kinazların inhibisyonu, DNA topoizomerazları ve anti-anjiyogenez, oksidatif DNA hasarını azaltma gibi çeşitli etkiler de sergilemiştir [75, 76]. Hayvan modellerinde yapılan araştırmalarda,

tümör hücresi çoğalmasını azaltabildiğini, apoptozu artırdığı ve farelerde yapılan çalışmalarda anjiyogenezi inhibe edebildiğini ortaya konmuştur [77]. Genisteinin yolaklar üzerine etkisi, Bax-Bcl-2 oranını, kaspaz-3 aktivitesini ve aşağı regülasyonu artırarak apoptozu indüklediği bilinmektedir. İnsan meme kanseri MDA-MB-231 hücrelerinde yapılan çalışmada NF-κB üzerinde etkisi olduğu bulunmuştur. Kaspaz-12'yi aktive ederek insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinde apoptozu artırdığı gözlemlenmiştir. Fosfotirozin kinaz aktivitesini modüle ederek ve N-Myc ekspresyonunu aşağı doğru düzenleyerek, nöroblastoma hücre dizilerinde farklılaşma ve apoptozu indüklediği ortaya çıkarılmıştır [77, 78].

Genistein, kanser hücrelerinde invazif ve metastatik özellikler kazandıran EMT'nin prostat kanseri hücrelerinde tersine çevirdiği, epitel belirteci E-kaderinin yukarı regüle edilmiş ekspresyonuna neden olduğu bulunmuştur [79]. Qin ve arkadaşları, Genistein'in hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve kolorektal kanser HCT-116 ve LoVo hücrelerinde apoptozu indüklediğini, Bax'ın yukarı regülasyonu ve Akt fosforilasyonunun aşağı regülasyonunun eşlik ettiğini gösterilmiştir [80].

Çeşitli çalışmalarda, genisteinin hücre döngüsü ilerlemesinin düzenleyicilerine müdahale ederek hücre döngüsünün durmasına neden olduğunu göstermektedir. Hücre büyümesinin inhibisyonu, siklin B1'in eşzamanlı aşağı regülasyonu, p21 ve p27'nin yukarı regülasyonu ve CDK4'te güçlü bir azalma etkisi göstermiştir [81, 82]. Genistein, PTK aracılı sinyal mekanizmalarını inhibe ederek kanser hücrelerinin büyümesini zayıflatabilen protein-tirosin kinazın (PTK) bilinen bir inhibitörüdür. Sakla ve arkadaşları, genisteinin, meme kanseri hücrelerinde protoonkogen olan HER-2 protein-tirozin fosforilasyonunu inhibe ettiğini ve HER-2 genini aşırı eksprese eden transgenik farelerde tümör başlangıcını geciktirdiğini bildirmiştir. Bu veriler ışığında, meme kanserinin kemoterapisindeki potansiyel anti-kanser rolünü desteklemektedir [83, 84].

Diğer izoflavonoidlerden farklı olarak, Geisteinin toksisitesini uyguladığı konsantrasyonlar, biyolojik ve farmakolojik etkilerinin çok üzerindedir. Bu özellik,

Genisteinin potansiyel bir kemopreventif ajan olarak oldukça tercih edilir kılar [77].

Genisteinin avantajlarının yanısıra düşük suda çözünürlük ve zayıf oral biyoyararlanım gösterir. Ayrıca, genistein oral uygulamadan sonra hızla metabolize olur ve bu biyoaktif bileşiğin emilimini ciddi şekilde etkiler [85].

## 2.4 İlaç Taşıyıcı Sistemler

Terapötik ajanların dağıtımını, nanotıpta ilaç taşıyıcı sistemlerinde önemli bir nanoteknoloji alanıdır. Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemleri, küçük moleküller, peptitler, protein bazlı ilaçlar ve nükleik asitler gibi terapötik moleküllerin kapsüllenme kabiyeti sağlamıştır [8, 86]. Geleneksel ilaç uygulamalarında, seçicilik, zayıf etkinlik, istenmeyen yan etkiler, düşük verimlilik ve zayıf biyolojik dağılımdan kaynaklı problemler karşılaşılr [87, 88].

Hedefleme ilaç taşıyıcı sistemleri, terapötik ajanın hücre veya dokudaki konsantrasyonunu artırır. Bu özellik, ajanın sistemik toksisitesini düşürürken, terapötik aktivite artırır bunun sayesinde düşük doz kullanımınıyla, yüksek bir terapötik indeks elde edilmesini sağlar [89, 90]. İlaç dağıtımını kontrol etmek, bu sınırlamaları ve engelleri aşmak için yararlı sistemlerdir. Ayrıca suda çözünmeyen terapötik ajanları fizyolojik engellerden korur ve biyoyararlanımlarını artırarak nanopariküller içine hapsedilir [91, 92].

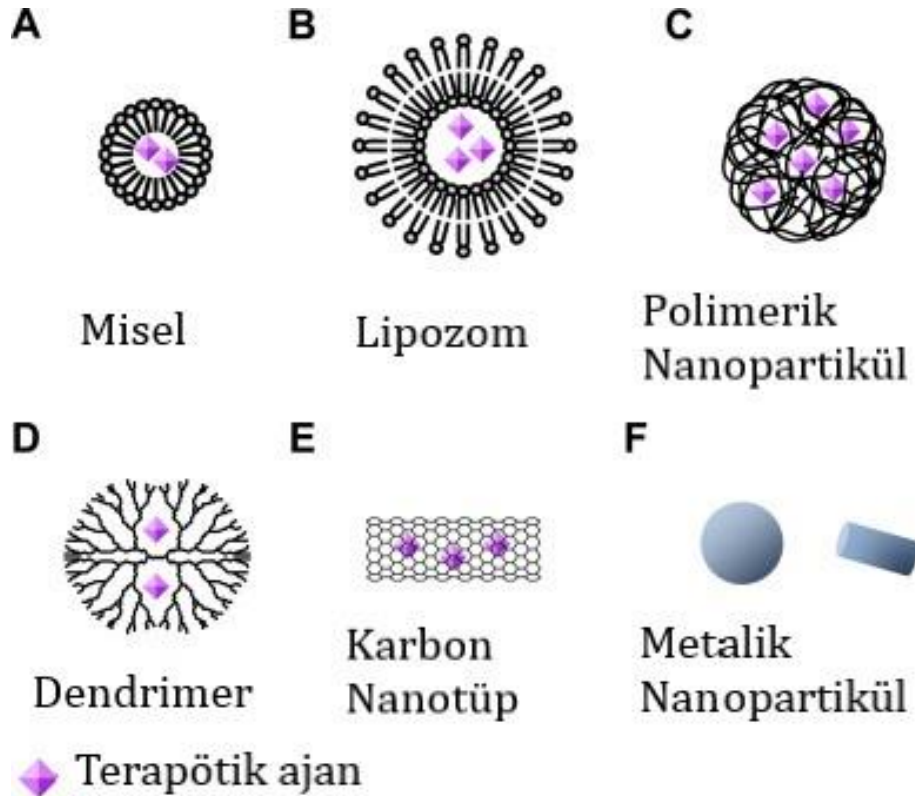
İlaç taşıyıcı sistemleri, terapötik ajan hedef tümör bölgesine iki şekilde ulaştırır. Bunlar; pasif hedefleme ve aktif hedeflemedir [93].

Pasif hedefleme, tümör dokusunun patofizyolojik özelliğini kullanarak hedef bölgenin geçirgenliğini kullanan mekanizmadır. Tümör hücrelerinin karakteristik özelliğinden biri olan anjigenez de meydana gelen hücrelerin aşırı büyümesi, kusurlu vasküler ve hipervasküler yapı kullanılır [94]. Buna ek olarak, tümör hücreleri fazla geçirgenlik medyatörlerine sahip olup fonksiyonel lenfatik drenajdan yoksundur. Bu yeni kan damarları, zayıf bir şekilde düzenlenmiştir bu yüzden sızdıran delikli bölgelere sahiptir. Bu nedenle düşük moleküler ağırlıklı kemoterapötik ajanların tümör bölgesine girmesi için kullanılır. Bu şekilde

hedeflenen ilaçlar, tümörün patofizyolojik özelliğine dayandığı için 'pasif hedefleme' denmektedir. Pasif hedeflemede de dikkat edilmesi gereken nokta, ilacın yükü, boyutu ve yüzeyi gibi fizikokimyasal özellikleridir [95, 96].

Aktif hedefleme, diğer bir adıyla da ligand aracılı hedefleme, tümör hücreleri tarafından spesifik şekilde tutulması ve hücreye alınması için partikülün yüzeyindeki afinite ligandlarını hedeflemektedir. Ligandların hedef bölgelerdeki farklı epitoplardan veya reseptörleri seçilerek bağlanır. Bu şekilde afiniteden yararlanılarak aktif olan terapötik ajanlar hedeflenen bölgeye yakın olması gerekir [97, 98]. Bu partiküllerin tasarlanmasında birkaç faktör etkilidir. Bunlar; ligandın konjugasyon yapısı, ligandın türü, partikülün formu ve uygulama yöntemi sayılabilir. Ligandlar olarak proteinler, vitaminler, nükleik asitler, şekerler ve antikorlar hedef bölgede veya hücrenin yüzeyinde bulunur [99].

Hedeflenmiş ilaç sistemlerinde (Şekil 2.4) en sık kullanılan türleri; lipozomlar, miseller, dendrimerler, nanokristaller ve nanopartiküller [100].



Şekil 2. 4 İlaç taşıyıcı sistemler (A) Misel (B) Lipozom (C) Polimerik nanopartikül (D) Dendrimer (E) Karbon nanotüp (F) Metalik nanopartikül [101]

Lipozomlar, 0.02-3.5 µm boyutunda lipid çift katmanlı yapıları küresel olup genellikle amfifilik fosfolipid moleküller ile hazırlanan veziküler sistemlerdir. Böylelikle hücre zalarında doğal olarak bulunan fosfolipidlere ve lipoproteinlere yapısal olarak benzerlik göstermeleri özelliğinden dolayı biyolojik uyumlu, vücutta parçalanabilir ve toksik etkiler gözlenmez [102, 103].

Miseller, 5-100 nm boyutunda polimerik veya lipid bazlı amfifilik özellikte sulu ortamda moleküllerin kendiliğinden bir araya gelmesiyle oluşur. İç kısımları hidrofobik özellikte yağda çözünen ilaçlar için avantaj sağlarken dış kısmı ise hidrofilik yapıdadır [104, 105].

Dendrimerler, çekidekleri etrafında dallanan fonksiyonel grupları içeren küresel sentetik yapılardan oluşur. Dallanma noktalarının sayısı ile moleküler boyutu doğru orantılıdır. Sentez sırasında moleküler boyutları ve ağırlıkları istenilen şekilde kontrol edilir bu nedenle farklı uygulamalar için tasarlanır [106]. Dendrimerler, etken molekülün dendrimerik yapısında kapsüllenmesi veya yüzeyinin üzerindeki fonksiyonel gruplar ile etkileşimiyle oluşturulur. Bu grupların, modifikasyonu ile moleküllerin hidrofilik veya hidrofobik özellikte hazırlanabilir ayrıca hedeflenen ilaç taşınması için çeşitli ligandlar eklenebilir [107, 108].

Nanokristaller, tamamı ilaç moleküllerinden oluşan nanometre parçacık boyutlarına sahip olan kristal yapılardır. Yüzey alanları, mikron boyundaki parçacıklardan daha fazla olduğundan partiküllerin çözünme hızı artar. Dolayısıyla biyoyararlanımda da artışa neden olur. Vücuda giren etken moleküllerin etkili olabilmeleri için hedef dokuda çözünmeleri ve moleküler halde olmaları gerekmektedir. Hedef doku dışında bölgelere giden nanokristallerin toksisitelerine dikkat edilmesi gerekir [109, 110].

#### **2.4.1 Nanopartiküller**

İlaç dağıtımı, nanotıpta özellikle ilaç taşınma sistemlerinde önemli etki yaratan nanoteknoloji alanıdır. Nanoteknoloji alanında son yıllarda, nanopartiküller (NP'ler) ilaç taşıyıcı sistemleri arasında en sık kullanılan yapılardır. Nanopartiküller 10 ile 1000 nm arasında boyutlarda gelişmiş reaktif alan ve hücre

veya doku bariyerlerini aşma gibi ayırt edici özelliklere sahip olduğu bilinmektedir [111]. Moleküllerin nano taşıyıcılar içine hapsedilerek, ilaçların çözünürlüğü ve stabilitesi geliştirilebilir ayrıca zayıf farmokinetik özellikleri olan ilaçların kullanımına olanak sağlar. Nano boyutlarında olan taşıyıcılar, biyolojik engellerin aşılmasında ve hücresel alımların gerçekleşmesinde önemli sistemlerdir. Bu özelliklerinden dolayı NP'ler biyomedikal uygulamalar için umut verici madde haline gelmiştir [112].

Beyin, KBB'den dolayı ilaçların hedef bölgeye ulaştırmasının en zor organlardan biridir. KBB, enzimatik aktiviteye ve yabancı maddelerin beyne girmesini önleyen sıkı bağlantılarla birbirine bağlanan beyinin entodel hücrelerinden oluşur. Suda çözünen moleküllerin, kan dolaşımından MSS'e geçişini engelleyerek yalnızca moleküllerin seçici geçirgen taşınmasına izin verir. Nanopartiküllerin varlığında, KBB boyunca beyne iletilmesinin verimliliği ve terapötik potansiyeli yüksek tedavi stratejilerinden biridir [113, 114].

Nanopartiküller, nanoküre ve nanokapsül olarak hazırlama yöntemlerine göre gruplara ayrılırlar. Nanoküreler, etken molekül partikül matrisi içinde homojen bir şekilde dağılır. Nanokapsüller ise partikül membranın çekirdek boşluğu veya kapsül yüzeyinde absorbe olmuş şekilde etken molekülleri bulundurur [115, 116].

Metastaz gibi birçok hastalığın ilerlemesine neden olan anjiyogenez, önceden var olan bir kan damarından yeni kan damarlarının oluşumudur. Küre şeklindeki altın ve silika nanopartiküllerin, anjiyogenezi üzerinde etkili olarak süreci baskılamıştır. Arviso ve arkadaşları, altın nanopartiküllerin çekirdek boyutunun vasküler endotelial büyüme faktörü 165'in (VEGF165) işlevini inhibe etmede önemli bir rol oynadığını belirtmiştir [117]. Wierzbicki ve arkadaşları da, elmas nanopartiküllerin glioblastoma tümörlerinde vasküler ağı ve VEGFA ve bFGF'nin mRNA düzeylerini azalttığını göstermiştir [118].

#### **2.4.1.1 Polimerik nanopartikül**

Polimerik nanopartikül, biyoyumlulukları ile biyolojik parçalanabilirlikleri sebebiyle, PLA ve PLGA gibi polyester ve kopolimeri biyoaktif moleküler içeren sistemleri oluşturan biyomalzemelerdir. Bu sistemler yüksek aktivite göstermesi



için hidrofobik ilaçlarla fiziksel veya kimyasal etkileşim gösterirler bu da hedeflemenin verimliliği ve çözünürlüğü artırarak hidrofilik polimerler kullanılır [119, 120].

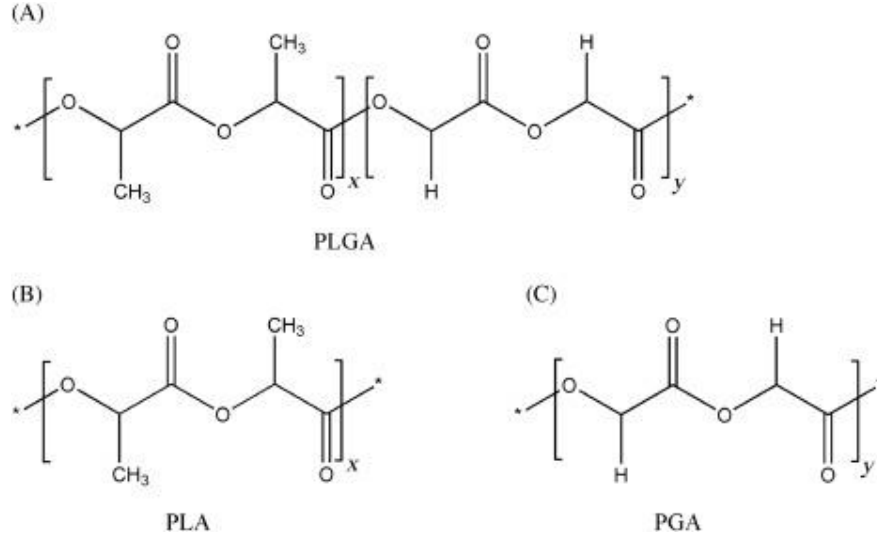
Nanoteknolojide tümör hedefli toksisiteyi azaltan, biyouyumlu ve biyolojik bozunabilir nanosistemlerin malzeme seçimi temel konulardan biridir. Çeşitli sentetik polimerler (örn. Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)), doğal polimerler (örn., Kitosan, kondroitin sülfat ve hyaluronik asit), lipidler (örn., fosfolipid ve kolesterol), nükleik asitler (örn., DNA), peptidler / proteinler (örn., albümin ve lizozim) ve inorganik malzemeler (örn., altın, demir, gümüş ve çinko) terapötik tedavilerde hazırlanmak üzere kullanılır [121].

Polilaktik asit (PLA), polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA), nişasta ve kitosan gibi biyolojik olarak parçalanabilen ve biyouyumlu polimerlerden oluşan nanopartiküller olup, çeşitli ilaçların dağıtımı için yaygın olarak kullanılmaktadır [122]. Poli-g-Glutamik asit (PGA),  $\alpha$ -amino ve g-karboksil grupları arasında oluşan amid bağları ile birbirine bağlanan D- ve L-glutamik asit monomerlerinden oluşan bir homo-poliamiddir ve proteazlardır. PGA, her glutamat biriminde kiral bir merkeze sahip optik olarak aktif bir biyopolimerdir [123].

Bu malzemelerin içinde PLGA, ilaç taşıma sistemlerinde nanopartiküller için tercih edilen bir maddedir. PLGA, metabolik yollara girebilen laktik asit (LA) ve glikolik asit (GA) oluşur. Bu monomerler vücutta basitçe metabolize edilir. Krebs döngüsü yoluyla karbondioksit ve su olarak ayrılır. Böylece minimum toksisite ile sonuçlanır. Laktik asit, glikolik asitten daha hidrofobiktir ve bu nedenle, laktik asit bakımından zengin PLGA kopolimerleri daha az hidrofildir, daha az su emer ve sonuç olarak daha yavaş bozunur [124].

Polimerik nanopartiküllerden biri olan, biyouyumlulukları, ilaç uyumlulukları, uygun biyolojik parçalanabilirlikleri ile mekanik özellikleriyle PLGA gibi polyesterin kopolimeri biyoaktif içeren moleküllerin şekil ve boyutları kolaylıkla işlenip imal edilebilir. Bu sistemler yüksek aktivite göstermesi için hidrofobik ilaçlarla fiziksel veya kimyasal etkileşim gösterdiklerinde bu hedefleme verimliliği

ve çözünürlüğü artırılarak hidrofilik polimerler kullanılır [125, 126]. PLGA, PLA ve PGA moleküllerinin Şekil 2.5'de kimyasal yapıları verilmiştir.



Şekil 2. 5 (A) PLGA yapısı (B) PLA yapısı (C) PGA yapısı [127]

#### 2.4.1.2 Glioblastoma Tedavisinde Nanopartiküller

Nanomateriyaller, GBM zorluklarından biri olan KBB'nin üstesinden gelmede ayrıca aktif bileşiklerin olumsuz özelliklerini azaltma veya etkinliklerini geliştirme potansiyelindedir. KBB, büyük moleküllerin %100'ünü ve küçük moleküllerin %98'ini terapötik seviyelere ulaşması için beyne yeterince molekülün ulaşamamasına neden olur [128]. Beyne etken molekülleri ulaştırmak için nanopartiküllerin kullanılması, KBB'yi geçen ilaç yüzdesini artırma potansiyeline sahiptir [10].

Beyne ilaç iletimi için polimerler (miseller, dendrimerler), inorganik malzemeler (demir, silika, altın) veya lipidler (lipozomlar, katı lipid nano taşıyıcılar) çeşitli sistemler kullanılmaktadır. Terapötik ilaçlar partiküllere kapsüllenmesi, kovalent bağlama veya yüzeyine yüklenerek lokalize olarak taşınır. İlaç taşıma sisteminin tasarımıyla, ilaçların etkilerini göstermek için aktif veya pasif olarak tümöre hedeflenir. Nanopartiküller hidrofilik veya hidrofobik ilaçlar kapsüle edilebilir, ilaç salınımını sağlayarak dolaşımdaki ilacın yarı ömrünü uzatmaya yarar [128].

PLGA nanopartikülleri, sentetik nanopartiküller olup biyoyumlulukları ve biyolojik olarak parçalanabilirliği gibi özelliklere sahiptir. Hem hidrofobik

moleküllerin hem de lipofilik moleküllerin taşınmasını sağlar. PLGA nanopartikülleri aynı anda birden fazla moleküller yüklenebilir. Glioma U87 ve C6 hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, paklitaksel ve temozolomid birlikte enkapsüle edilen PLGA nanopartikülleri hedeflendiğinde hem in-vitro hem in vivo deneylerde büyümeyi inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği görülmüştür [129]. Diğer bir çalışmada, klorotoksin ve temozolomid yüklü nanopartikül insan glioblastoma hücreleri üzerinde serbest ilaca göre hücre öldürmede etkili olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca nanopartikül KBB'yi geçebildiği ve toksisiteyi en aza indirdiği gösterilmiştir [130]. Bu tez çalışmasında da, genistein ve temozolomid yüklü PLGA nanopartiküller ile daha etkin bir glioblastoma tedavisi gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır.

### 3.1 Materyal

#### 3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- pH metre- Hanna
- Otoklav- Hirayama
- Hassas Terazi- Shimadzu
- Sonikatör- Bandelin Sonoplus
- Peristaltik Pompa- Masterflex Core Palmer
- CO<sub>2</sub> İnkübatör- Biosan ES20
- UV-Vis Spektrofotometre- Shimadzu UV- 1800
- Liyafilizatör- Telstar Cryodos
- Biyogüvenlik Kabini- Hedlab XPROII
- Çalkalayıcı- Biosan Environmental Shaker ES20
- Mini Santrifüj Cihazı- Hermle Z 206 A
- Sıvı Azot Tankı- International Cryogenics, Inc. 20R
- Distile Su Cihazı- Sartorius Arium Pro
- Zeta Sizer- Malvern ZEN 3600 Nano ZS
- Vorteks- Velp Scientifica
- Elisa Reader- BioTek PowerWave XS2
- Invert Mikroskop- Olympus CKX41
- Ters Floresan Mikroskop- ZEISS AxioVert01
- Santrifüj Cihazı- Beckman Coulter Allegra X-30 R
- Ultrasonik Su Banyosu- Bandelin Sonorex
- Manyetik Karıştırıcı- Variomag Mono
- FT-IR- Thermo Scientific Nicolet iS10

- Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)- ZEISS EVO LS10
- Çoklu Manyetik Karıştırıcı- IKA
- Western Transfer Sistemi- Trans-Blot Turbo Transfer System
- Real Time PCR Cihazı- AriaMx Real-Time PCR System
- SDS-PAGE Elektroforez Sistemi- BIO-RAD MiniPROTEAN® 3 Cell
- Nanodrop-Thermo Scientific NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers

### 3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

- Hücre Kültür Plakları( T25, T75)- NEST
- Serolojik Pipetler (1ml, 2ml, 5ml, 10ml ve 25ml)- Eppendorf
- Parafilm- Bemis PM-996
- Thoma Lamı- Isolab
- Beher- Isolab
- İnce uçlu pens
- Hücre dondurma tüpleri- NEST 607001
- Filtre Kağıdı- BIO-RAD 1703965
- Trans Blot Turbo Transfer Pack-BIO-RAD 1704158
- Steril Tek Kullanımlık Şırınga- Set Medikal
- 15ml'lik steril falkon tüpler-NEST 601002
- Steril plastik pipet ucu 1000 µl- ISOLAB I.005.01.003.500
- Steril plastik pipet ucu 200 µl- ISOLAB I.005.01.002.901
- Steril plastik pipet ucu 10 µl- ISOLAB I.005.01.001.901
- Nitroselüloz Transfer Membran- Thermo Scientific 88018
- 96 kuyulu mikrolaka- ISOLAB I.122.11.096
- 24 kuyulu plaka- SPL Life Sciences 13485
- 50 ml'lik steril falkon- CAPP 5100050
- 15 ml'lik steril falkon- ISOLAB S.078.02.002.050
- PVDF Membran- BIO-RAD 1620177
- 2 ml mikrosantrifüj tüpü- NEST 620011
- 0,2 mikrolitrelik PCR tüpü- Axygen 15216383

- 96 kuyulu PCR mikroplaka- CELLSTAR 655160

### 3.1.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler

#### Nanopartikül sentezi için

- Genistein- Sigma Aldrich G6776
- Temozolomid- Sigma Aldrich T2577
- Etanol- Merck 64-17-5
- Diklorometan- Merck
- Poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA)- Sigma Aldrich 719870
- Polivinil Alkol- Sigma Aldrich 363138

#### Hücre Kültürü için

- DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)- Thermo Scientific 11320033
- Penisilin/Streptomisin- Sigma Aldrich P4333
- Fetal Sığır Serumumu- PAN BIOTECH P30-1904
- Tripsin-EDTA- Sigma Aldrich T4049
- L-glutamin 200 mM- Gibco 1881732
- Tripan Mavisi- Sigma Aldrich T8154
- Sodyum Klorür- Sigma Aldrich 13423
- Monosodyum Fosfat- Sigma Aldrich 04270
- Disodyum Fosfat Dihidrat- Sigma Aldrich 04272
- Hidroklorik asit- Sigma Aldrich 30721
- Sodyum Hidroksit- Sigma Aldrich 71690
- Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide %98- Sigma Aldrich M5655
- Dimetil sülfoksit- ChemCruz sc358801/Carlo Erba 508002

#### Proliferasyon testi için

- BrdU deney kiti- RocheMolecular Sciences 11 647 229 001

#### Total RNA izolasyonu için

- Direct-zol RNA MiniPrep kiti- Zymo Research R2050
- cDNA sentez kiti- SensiFAST
- Real Time PCR SYBR Lo-Rox Kit- SensiFAST BIO 94020

### **Western Blot için**

- Proteazfosfataz inhibitör kokteyl..X- Sigma Aldrich PPC1010
- RIPA 10x- Abcam ab156034
- BCA Protein Biyoanaliz Kiti- SMART™ 21071
- SDS- Sigma 101536917
- TEMED- Sigma 102051196
- Akrilamid/Bis- Biorad 1610158
- Glacial asetik asit- TEKKİM 251011531
- Gliserol- Riedel de Haen 15524
- Amonyum persülfat- Sigma 06429KH
- Tris baz- Sigma 1001765977
- B-merkatoetanol- MERCK 8.05740.0250
- HCl- Sigma 30721
- Metanol- Sigma STBG2513V
- Coomassie brilliant blue- AppliChem A1092
- Glisin- Sigma G8898-500G
- Bromfenol mavisi- Sigma 114391
- Yağsız süt tozu- BioshopSKI400.500
- Tween20- AppliChem A1389
- 0.45 µm nitroselüloz membran- Thermo Scientific SI23993310
- 0.2 µm nitroselüloz Trans-blot turbo transfer pack- 1704158
- Anti-caspase-3 antikor- Abcam ab13847
- Cleaved caspase-9 primer antikor- Rabbit Abcam ab2324
- Beta-actin primer antikor- Rabbit Cell signaling technology 4967S
- Sitokrom-c primer antikor- Mouse Invitrogen 338500
- Goat anti-rabbit IgG H&L sekonder antikor- Abcam ab205718
- Goat anti-mouse IgG H&L HRP- Abcam ab205719
- H2O2- Sigma Aldrich 18304
- DAB- Thermo Scientific 34001

### **3.1.4 Kullanılan Solüsyonlar ve Tamponlar**

#### **3.1.4.1 Farklı konsantrasyonlardaki Temozolomid çözeltileri**

1 mg temozolomid molekülü 10 ml distile su ile çözülerek 0,1 mg/ml'lik stok çözelti elde edildi. Stok temozolomid çözeltisi seyreltilerek 0,01; 0,02; 0,03; 0,009; 0,008; 0,007; 0,006; 0,005; 0,004; 0,003; 0,002; 0,001 mg/ml'lik farklı konsantrasyonlar hazırlandı. Çözeltinin UV-Vis spektrofotometrik ölçümleri sonucunda maksimum absorbands dalga boyu 330 nm olarak ölçüldü. Elde edilen UV şiddetleri kullanılarak standart kalibrasyon eğrisi çizildi.

#### **3.1.4.2 Farklı konsantrasyonlardaki Genistein çözeltileri**

1 mg genisteinin 10 ml etanol içerisinde çözülmesiyle, 0,1 mg/ml genistein stok çözeltisi elde edildi. Bu stok genistein çözeltisi 0,01; 0,009; 0,008; 0,007; 0,006; 0,005; 0,004; 0,003; 0,002; 0,001; 0,0009; 0,0008; 0,0007; 0,0006; 0,0005; 0,0004; 0,0003; 0,0002; 0,0001 mg/ml olacak şekilde seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda genistein çözeltileri hazırlandı. UV-Vis spektrofotometresindeki ölçümlerle genisteinin maksimum dalga boyu 264 nm olarak belirlendi. Farklı konsantrasyonlardaki genistein etanol çözeltilerinin UV absorbands değerleri kullanılarak standart eğri grafiği çizildi.

#### **3.1.4.3 Polivinilalkol (PVA) Çözeltisi**

%3'lük polivinilalkol çözeltisi için 3 gram polivinilalkol hassas tartıda tartıldı. Üzerine 100 ml distile su eklenip 65-75 °C derecede manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojen polivinilalkol elde edildi.

%0,1'lik polivinilalkol çözeltisi için 0,1 gram polivinilalkol hassas tartıda tartıldı. Üzerine 100 ml distile su eklenip 65-75 °C derecede manyetik karıştırıcıda karıştırılmasıyla homojen polivinilalkol elde edildi.

#### **3.1.4.4 0,01 mol/L'lik PBS (pH=7,4)**

PBS hazırlamak için 0.5844 gram NaCl sodium klorür, 1.1998 gram NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 1.7799 gram Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O tartılıp 1L distile su içerisinde çözdürüldü. Tampon çözeltisi olarak pH'nın 7.4'e ayarlanması için NaOH ve HCl kullanıldı ve sterilizasyonu otoklavlanarak sağlandı.



#### **3.1.4.5 %10'luk DMEM/F12 Besiyeri**

DMEM/F12 kültür besiyeri ticari olarak satın alındı. Besiyeri içerisine 100 µg/mL penicillin, 100 µg/mL streptomisin ve %1 L-glutamin eklendi. Hücreler %90 oranında DMEM/F12 ve %10 oranında FBS içeren tamamlanmış besiyerinde büyütüldü. Hazırlanan besiyeri deneye kadar +4°C'de muhafaza edildi.

#### **3.1.4.6 Hücre Dondurma Solüsyonu**

Hücrelerin uzun süreli saklanması sağlayan dondurma solüsyonu %95 fetal sığır serumu (FBS) ve %5 DMSO çözeltileri ile hazırlanmıştır. İnsan beyin kanseri U87MG hücreleri kademeli şekilde önce -20°C'de ve -80°C'de dondurucuda bekletildi. Daha sonra -196°C sıvı azot tankına alınarak ileri hücre deneylerinde kullanılması için saklandı.

#### **3.1.4.7 MTT Solüsyonu**

MTT tetrazolium tuzundan 12 gram hassas terazide tartılıp, 20 ml PBS içerisinde falkon folyoya sarılarak vorteksenerek çözdürüldü. 0.22 µm filtreden geçirilerek kullanılıncaya kadar +4°C' de saklandı.

#### **3.1.4.8 Protein Lizatlarının Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler**

Protein lizatlarının hazırlanmasında RIPA ve proteaz fosfotaz inhibitörü (ppi) içeren lizis tamponu hazırlandı. RIPA çözeltisi 5X'den 1X'e seyreltilerek kullanıldı. 1X RIPA çözeltisinden 1ml alınarak içerisine 10µl proteaz fosfotaz inhibitöründen eklenerek lizis çözeltisi hazırlandı.

#### **3.1.4.9 Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

Smart™ BCA Protein Biyoanaliz Kiti içindeki solüsyon A ve B'den sırasıyla 50:1 olacak şekilde karıştırılarak çözelti hazırlandı.

#### **3.1.4.10 SDS-PAGE'de Kullanılan Çözeltiler**

##### **2x SDS-PAGE (Sample Buffer)**

0,5M Tris-HCl (pH:6.8)	2,5ml
Gliserol	2ml

B-Merkaptoetanol	0,4ml
Bromfenol Mavisi	0,02 gram
SDS	0,4 gram

Total hacim 10 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanır.

#### **%10 (w/v) SDS**

SDS	10 gram
Distile Su	90 ml

Yavaşça karıştırarak çözünmesi sağlanır ve 100 ml'ye distile sui le tamamlanır.

#### **Acrylamide / Bis**

N-N-Bis-Metilen-Akrilamid	2,40 gram
Akrilamid	87,60 gram
Distile Su	300 ml

Çözelti +4C'de karanlıkta 30 gün boyunca saklanabilir.

#### **SDS-PAGE Protein Boyama Çözeltisi**

Metanol	40ml
Coomassive Blue	0,1 gram
Glacial Asetik Asit	10ml

100 ml ile distile su ile tamamlanır.

#### **5x Tank Tamponu**

0,025M Tris Baz	15 gram
0,192M Glisin	72 gram
%0,1 SDS	5 gram

1000 ml distile su ile tamamlanır.

#### **1,5M Tris-HCl (pH:8.8)**

Tris Baz	27,23 gram
Distile Su	80 ml

Çözeltinin pH'ı HCl yardımıyla 8.8 ayarlanır. Akabinde distile su ile 150 ml tamamlanır.

#### **0,5M Tris-HCl (pH:6.8)**

Tris Baz	6 gram
Distile Su	60 ml

Çözeltinin pH'ı HCl yardımıyla 6.8 ayarlanır ve distile su ile 100 ml tamamlanır.

#### **%10 (w/v) APS**

Amonyum Persülfat	0,1 gram
Distile Su	1000 ml

Taze olarak hazırlanır.

#### **De-staining Solution**

%5 Metanol	50 ml
%7 Glacial Asetik Asit	70 ml

1000 ml distile su ile tamamlanır.

#### **%12'lik Ayırma Jeli**

Distile Su	3,35 ml
1,5M Tris-HCL (PH:8.8)	2,5 ml
%10'luk SDS	100 $\mu$ l
%30'luk Akrilamid/Bis	4 ml
%10'LUK APS	75 $\mu$ l
TEMED	15 $\mu$ l

#### **%4'lük Yükleme Jeli**

Distile Su	3,05 ml
0,5M Tris-HCL (PH:6.8)	1,25 ml
%10'luk SDS	50 $\mu$ l
%30'luk Akrilamid/Bis	0,65 ml
%10'luk APS	30 $\mu$ l

TEMED 6  $\mu$ l

### 3.1.4.11 Western Blot için Kullanılan Çözeltiler

#### %5'lik Süt Tozu

Yağsız Süt Tozu 5 gram  
PBS Tween-20 100 ml

#### PBS

NaCl 0,2922 gram  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5999 gram  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,8899 gram

PBS NaOH-HCl yardımıyla pH 7,4'e ayarlanır ve 500 ml distile su ile tamamlanır.

#### Transfer Tamponu

48 mM Tris Baz 5,81 gram  
39 mM Glisin 2,93 gram  
1,3 mM SDS 0,375 gram  
%20 Metanol 200 ml

Çözelti 1000 ml distile su ile tamamlanır.

#### PBS Tween-20

PBS 500 ml  
Tween-20 1 ml

#### Kolorimetrik Deteksiyon Çözeltisi

DAB 60mg  
PBS 100ml  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 $\mu$ l

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Temozolomid Molekülünün UV Standart Eğrisi

10 ml distile su içerisinde 1 mg temozolomid çözülerek stok temozolomid çözeltisi elde edildi. Bu çözelti, 0,01 mg/ml ile 0,009 mg/ml arasında seyreltilerek UV spektrofotometre cihazında UV şiddetleri ölçüldü. Farklı UV ölçülerine göre temozolomid çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

### 3.2.2 Genistein Molekülünün UV Standart Eğrisi

1 mg genistein tartılarak, 10 ml ethanol içerisinde çözülüp 0,1 mg/ml'lik genistein çözeltisi elde edildi. Genistein çözeltisi seyreltilerek 0,01 mg/ml ile 0,0002 mg/ml UV spektrofotometre cihazında ölçümleri alındı. Çözeltinin sahip olduğu dalga boyunda farklı konsantrasyonlardaki genistein çözeltilerinin UV şiddetlerine göre kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

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

Temozolomid, genistein etken maddelerinden 1'er mg ve 100 mg PLGA polimeri hassas tartıda tartıldı. Etken maddelerin ve PLGA'nın çözülmesi için distile su, etanol ve diklorometan çözeltileri hazırlandı. Temozolomid 1 ml distile suda, genistein 1 ml etanolde, PLGA ise 1,5 ml diklorometan (DCM) içerisinde çözdürüldü. Akabinde temozolomid-genistein nanopartikülünün hazırlanması için genistein, temozolomid'in içerisine katılarak vortekslendi. Çözdürülmüş genistein, temozolomid ve temozolomid-genistein, PLGA polimeri içerisine aktarıldı. Karışımlar, 4 ml %3'lük PVA içerisine peristaltik pompa ile 5 ml/dk akış hızında buzlu ortamda %80 Volt, 90 saniye sonike ederek aktarıldı. Dış fazlarını oluşturmak için 35 ml %0,1'lik PVA peristaltik pompa ile 2 ml/dk akış hızıyla karışımların içine eklendi. Sonrasında karışımların içerisinde bulunan organik çözücülerin uzaklaşması için 4 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldılar. Sonrasında katı nanopartikül elde edebilmek ve yüzeydeki kalıntıları uzaklaştırmak için çöktürme ve yıkama işlemine başlandı. Nanopartikül çözeltilerinin çöktürme işlemi 9000 rpm'de 40 dakika boyunca santrifüjlenerek

devam etti ve üst fazları bir beher içerisine toplandı. Nanopartikülleri yıkamak amacıyla üzerine 35 ml distile su eklenerek 9000 rpm'de 35 dakika 3'er kez tekrarlanarak santrifüj işlemi yapıldı. Yıkama işlemi boyunca da üst fazlar aynı behere toplandı. İşlem sonucu elde edilen nanopartiküllerin içerisine 5 ml distile su eklenip homojen hale getirildi. Homojen çözeltiler liyafizatörde kurutulup -20 °C'ye kaldırıldı. Bu yöntemle temozolomid içeren PLGA nanopartiküller (TmzNP), genistein içeren PLGA nanopartiküller (GenNP) ve temozolomid ve genistein içeren PLGA nanopartiküller (TmzGenNP) elde edilmiş oldu.

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

Üretilen nanopartiküllerin karakterizasyonu için etken madde yüklenme verimi, enkapsülasyon verimi ve reaksiyon verimi hesaplandı.

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

Elde edilen katı nanopartiküllerin reaksiyon veriminin hesaplanması için üretilen nanopartikül miktarı ile toplam kullanılan etken maddelerin ve polimerlerin miktarının birbirlerine oranı aşağıdaki eşitlikler kullanılarak gravimetrik olarak hesaplandı:

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

$$RV(\%) = \frac{\text{Üretilen nanopartikül miktarı}}{\text{Başlangıç polimer miktarı} + \text{Genistein}} \times 100 \quad (3.2)$$

$$RV(\%) = \frac{\text{Üretilen nanopartikül miktarı}}{\text{Başlangıç polimer miktarı} + \text{Temozolomid} + \text{Genistein}} \times 100 \quad (3.3)$$

### **3.2.6 Etken Madde Yüklenme Veriminin (DL) Hesaplanması**

Katı nanopartiküllerin üretiminde liyolizatörden elde edilen etken maddelerin miktarı kullanılarak nanopartiküllerin içerisine yüklenen madde miktarları indirekt olarak hesaplandı. Konsantrasyonları bilinen temozolomid nanopartikülleri (TmzNP1, TmzNP2), genistein nanopartikülü (GenNP),

temozolomid-genistein nanopartikülü (TmzGenNP) çözeltileri UV spektrumları alınarak standart kalibrasyon eğrileri çizildi. Etken madde yüklenme verimi (DL) eşitlikler kullanılarak hesaplandı:

$$DL(\%) = \frac{\text{Nanopartikül içine yüklenen temozolomid(mg)}}{\text{Elde edilen nanopartikül miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.4)$$

$$DL(\%) = \frac{\text{Nanopartikül içine yüklenen genistein miktarı (mg)}}{\text{Elde edilen nanopartikül miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.5)$$

$$DL(\%) = \frac{\text{Nanopartikül içine yüklenen temozolomid + genistein miktarı (mg)}}{\text{Elde edilen nanopartikül miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.6)$$

### 3.2.7 Enkapsülasyon Etkinliğinin (EE) Hesaplanması

Nanopartiküllerin içerisine yüklenen madde miktarları, santrifüj edildikten sonrası elde edilen üst fazlar kullanılarak belirlendi. Elde edilen üst fazların UV spektrumları alınarak TmzNP1, TmzNP2, GenNP, TmzGenNP için kalibrasyon eğrileri çizildi. Enkapsülasyon verimini hesaplamak için aşağıdaki eşitlikler kullanıldı:

$$EE(\%) = \frac{\text{Nanopartikül içine yüklenen temozolomid(mg)}}{\text{Kullanılan temozolomid miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.7)$$

$$EE(\%) = \frac{\text{Nanopartikül içine yüklenen genistein miktarı (mg)}}{\text{Kullanılan genistein miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.8)$$

$$EE(\%) = \frac{\text{Nanopartikül içine yüklenen temozolomid + genistein miktarı (mg)}}{\text{Kullanılan temozolomid + genistein miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.9)$$

### 3.2.8 Temozolomid-Genistein Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Üretilen katı nanopartiküllerin karakterizasyonu için Zeta Sizer ile boyut ve zeta potansiyel analizi, FT-IR ile kimyasal bağ analizi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile nanopartikülün morfolojik analizleri yapıldı.

### **3.2.8.1 Boyut ve zeta analizi**

Hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri Zetasizer Nano Z cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Boyut analizleri dinamik ışık saçılması yöntemiyle, zeta potansiyel ölçümleri ise kapiler kuvvetler kullanılarak faz analiz ışık saçılması yöntemiyle gerçekleştirildi. Tüm analizler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

### **3.2.8.2 FT-IR analizi**

Serbest temozolomid, serbest genistein, PLGA polimeri, temozolomid yüklü nanopartikül, genistein yüklü nanopartikül, temozolomid-genistein yüklü nanopartiküle ait fonksiyonel grupların belirlenmesi Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile gerçekleştirildi. Nanopartiküllerin FT-IR spektrumu Attenuated Total Reflectance (ATR) ataçmanı kullanılarak, 3 tekrarlı olacak şekilde elde edildi.

### **3.2.8.4 SEM analizi**

Elde edilen nanopartiküllerin agregasyonu, dağılımı, yüzey şekillerinin ve morfolojilerinin belirlenmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanıldı. Nanopartikül örnekleri altın tabaka ile yüksek vakum altında kaplandıktan sonra, 10.00 kV gerilim altında, 20.000x büyütmede SEM mikrografları elde edildi. .

### **3.2.9 Temozolomid-Genistein Nanopartiküllerin İn-vitro Salımı**

Temozolomid-genistein nanopartikülünden 3 mg tartıldı ve 3 ml PBS (pH:7.4) içerisinde çözdürüldü. Ardından yatay çalkalayıcıda 37°C'de 200rpm'de çalkalamaya bırakıldı. Örnekler periyodik aralıklarla 9000 rpm'de 20 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernantlar toplanarak UV spektrofotometrede ölçümleri alındı ve üst fazların üzerine taze PBS eklendi. Bu ölçüm 30 gün boyunca devam etti. Elde edilen üst fazların UV değerleri kullanılarak salınan nanopartikül miktarı hesaplandı.



### 3.2.10 İnsan Glioblastoma Hücre Hattının (U87MG) Kültüre Edilmesi

Hücre kültürü çalışmalarında insan glioblastoma hücre U87MG hattı (ATCC® HTB-14™) kullanıldı. U87MG insan glioblastoma hücre hattı 37° C'de %5 CO<sub>2</sub> ile nem içeren ortamda inkübatör içerisinde büyütüldü. Epitel morfolojisine sahip olan U87MG insan glioblastoma hücre hattı adherent büyüme özelliği göstermektedir. U87MG insan glioblastoma hücre hattının özellikleri Tablo 3.1'de yer almaktadır.

**Tablo 3. 1 İnsan glioblastoma hücre hattının özellikleri [131]**

U-87 MG (ATCC® HTB-14™)	
Cinsiyet	Erkek
Organizma	<i>Homo sapiens</i> , insan
Doku	Beyin
Ürün Formatı	Dondurulmuş
Morfolojisi	Epitel
Kültür özelliği	Adherent
Hastalık	Glioblastoma

### 3.2.11 İnsan Glioblastoma Hücre Hattının (U87MG) Açılması

Kriyotüplerdeki insan glioblastoma U87MG hücreleri sıvı azot tankından (-196°C) çıkartılıp distile su içerisinde çözümleri sağlandı. Daha sonra hızlı bir şekilde hücreler 15 ml'lik falkon içerisine tamamlanmış besiyeri ile birlikte alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Pellet kısmındaki hücreler, hücre sayısına göre T25 veya T75 flasklara alınarak inkübasyona bırakıldı. Flask yüzeyine tutunarak büyümekte olan U87MG hücreleri flask yüzeyinin yaklaşık %80'nini kaplayana kadar 2-3 gün boyunca 37° C'de %5 CO<sub>2</sub> ile nem içeren ortamda inkübe edildi

### 3.2.12 İnsan Glioblastoma Hücre Hattının (U87MG) Pasajlanması

İnsan glioblastoma U87MG hücrelerinin flaskta %70-80 konfluent hale geldiklerinde pasajlanması gerekmektedir. Hücre pasajlanması laminer hava akışı

steril kabinin içerisinde yapıldı. Pasajlanacak hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkandı. Hücrelerin kültür kaplarından kalkmalarını sağlayan serin proteaz enzimi olan 1x Tripsin-EDTA hücreler üzerine eklendi. Tripsin enziminin aktivite gösterebilmesi için, tripsin uygulanmış hücreler 37°C'lik inkübatörde 2-3 dakika bekletildi. Hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları ışık mikroskobu ile kontrol edildi, hücreler kültür kabı yüzeyinden ayrıldıklarında tripsin aktivitesini inhibe etmek için kültür kaplarına taze besiyeri eklendi. Hücreler 15ml'lik falkon tüpler içerisine aktarıldı ve 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra falkon içindeki süpernatant kısmı uzaklaştırılıp pellet üzerine taze besiyesi eklenerek pipetajlandı. U87MG hücreleri homojen şekilde dağıtıldıktan sonra yeni büyüme ortamları olan T25 veya T75 flasklarına aktarıldı. 37°C'de %5'lik CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre koyulup flask yüzeyi %70-80 oranında yoğunluğa eriştikten sonra pasaj işlemi tekrarlandı.

### **3.2.13 İnsan Glioblastoma Hücrelerinin (U87MG) Sayımı**

Hücrelerin sayısının belirlenmesi tripan mavisi boyama yöntemiyle gerçekleştirildi. Pasaj işlemi ile aynı protokol uygulanıp santrifüj aşamasından sonra hücre canlılığı belirlendi. Bunun için 1:1 oranında yani 50 µl tripan mavisi 50 µl hücre süspansiyonundan alındı ve yavaşça pipetaj yaparak hücrelerin homojen dağılması sağlandı. Thoma lamına pipet yardımı ile hücre-tripan mavisi karışımından 20 µl koyuldu. Işık mikroskobu ile Thoma lamındaki hücrelerin sayımı yapıldı. Parlak, renksiz olarak görülen hücrelerin canlı oldukları, boyayı hücre içine alanların ise cansız olduğu gözlemlendi. Sayılan hücreler Thoma lamındaki 4 farklı bölgedeki 16 karelerde bulunan hücrelerin ortalamaları ile hesaplanmıştır. Canlı hücre sayısı ise sayılan hücrelerin sayısının ortalaması, dilüsyon faktörü, toplam hacim ve 10<sup>4</sup> çarpımı ile hesaplanır.

### **3.2.14 İnsan Glioblastoma Hücrelerini (U87MG) Dondurulması**

U87MG insan glioblastoma hücre hattı daha sonraki deneylerde kullanılabilmesi amacıyla hücrelerin bir kısmı çoğaltılırken bir kısmı ise stoklanmak üzere donduruldu. U87MG hücre hattı %95 FBS, %5 DMSO ile hazırlanan dondurma solüsyonu kullanılarak içerisinde kademeli olarak donduruldu. İlk olarak

stoklanmak istenen flastaki hücreler içinde bulunan besiyeri pipet ile uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkandı. Tripsin eklendi ve flastaki hücrelerin kalkmaları sağlandı. Tripsini inaktif hale getirmek için hücreler üzerine besiyeri eklenip 15ml'lik falkona alındı. Falkon santrifüj edildikten sonra süpernant kısmı atıldı ve hücre pelleti 10<sup>6</sup> ml hücre sayısı olacak şekilde hücre sayımı gerçekleştirildi. Daha önce hazırlanan dondurma solüsyonu ile hücre yavaşça pipetajlanarak kriyotüp içerisine alındı. Kriyotüpler kademeli olarak soğutulması amacı ile kriyotüp soğutma kabına koyuldu ve -80°C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün -80°C'den alınan hücreler -196°C'deki sıvı azot tankının içerisine yerleştirildi.

### **3.2.15 Temozolomid-Genistein Nanopartiküllerin *in vitro* Biyolojik Etkinliğinin Araştırılması**

#### **3.2.15.1 MTT Testi**

MTT yöntemi kullanılarak insan glioblastoma hücre hattına (U87MG) uygulanan temozolomid, genistein, temozolomid-genistein kombinasyonu, TmzNP, GenNP, TmzGenNP'lerin sitotoksik etkileri belirlendi.

Kullanılacak hücre hattı olan U87MG 96 kuyulu mikrolakalara kuyu başına 10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde ekildi ve 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Serbest temozolomid, serbest genistein, temozolomid-genistein kombinasyonu, TmzNP, GenNP, TmzGenNP'nin farklı konstrasyonlarda hücreler üzerine uygulandı. Daha sonra mikrolaklar 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı ve hücrelerdeki sitopatolojik değişiklikler kontrol grubuyla kıyaslama yapılarak mikroskopta incelendi. 24, 48 ve 72 saat sonunda her bir kuyucuktaki besiyerleri çekilerek, kuyucuklara 50 µl MTT solüsyonu eklenip hücreler yaklaşık 4 saat süre ile 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuk üzerine 100 µl DMSO eklenerek hücreler üzerinde oluşan formazan kristallerinin çözdürülmesi sağlandı. DMSO ile çözdürülen mikrolakların ELISA ile 570 nm'de absorbans değeri okutuldu ve % hücre canlılıkları belirlendi. IC<sub>50</sub> değeri hesaplandı.

### 3.2.15.2 Kombinasyon İndeksinin Hesaplanması

İlaç sinerjisi, CalcuSyn yazılımı (Biosoft Version 2.1, Cambridge, UK) kullanılarak medyan etki prensibinden türetilen kombinasyon indeks metodu ile değerlendirildi. MTT deneyinden elde edilen veriler temozolomid ve genistein kombinasyon indeksinin hesaplanmasında temel alındı. IC<sub>50</sub>, kombinasyon indeksi (CI) ve doz azaltma endeksi (DRI) değerlerinin hesaplanmasında CalcuSyn yazılımı kullanıldı. CI değerleri <1 ise sinerjizmi göstermekte, CI=1 ise ilave bir etki gösterir ve CI > 1 ise antagonizmi göstermektedir [132].

### 3.2.15.3 Yara İyileşmesi Testi

İnsan glioblastoma U87MG hücreleri 24 kuyucuklu kültür plakalarına kuyu başına 10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde ekildi. U87MG hücreleri konfluent olduklarında besiyeri içindeyken 200µl'lik sarı pipet ucu ile kuyucukların hepsine yukarıdan aşağıya doğru düz bir çizgi çekildi. Mikroskopta çizgiler kontrol edildikten sonra besiyerleri uzaklaştırılığ üzerlerine uygulanacak etken maddeler IC<sub>50</sub> değerlerine göre eklendi. 0, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde ışık mikroskopunda her bir alanın fotoğrafı alınarak ImageJ programı ile hücre sayımı ve aralarındaki mesafeler 3 tekrarlı olarak ölçüldü.

### 3.2.15.4 5-Bromo-2-Deoksiüridin (BrdU) Kolorometrik Yöntemi ile Anti-proliferatif Aktivitenin Belirlenmesi

Hücre proliferasyonu, üreticinin talimatlarına göre BrdU kolorimetrik yöntemi kullanılarak ELISA okuyucusunda değerlendirildi. U87MG insan glioblastoma hücreleri, 96 kuyucuklu hücre kültürü plakaların üzerine 1x10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde ekildi. U87MG hücreleri üzerine TmzGenNP'ler ve Tmz/Gen kombinasyonu uygulandıktan sonra hücreler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben, her kuyucuğa 10 uM BrdU etiketleme solüsyonu eklendi ve hücreler 2 saat 37°C'de yeniden inkübe edildi. Ardından besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa FixDenat solüsyonu uygulandı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, FixDenat solüsyonu uzaklaştırıldı, her kuyucuğa anti-BrdU-POD çalışma solüsyonu ilave edildi. Hücre plakası oda sıcaklığında 90 dakika inkübe edildi. Antikor konjugatının

uzaklaştırılmasının ardından kuyucuklar yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı. Her kuyucuğa substrat solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Numunelerin absorbansları, 492 nm'lik bir referans dalga boyu ile 370 nm'de bir ELISA okuyucusunda ölçüldü. Tüm deney üç tekrar halinde yapıldı. BrdU-pozitif ve BrdU-negatif numuneler arasındaki farklar Optik Yoğunluk olarak ifade edildi.

### **3.2.15.5 Total RNA İzolasyonu**

U87MG hücreleri T25 flasklara ekildi ve hücrelerin üzerine Tmz/Gen kombinasyonu ile TmzGenNP IC<sub>50</sub> dozlarına göre 48 saat süre ile uygulandı. RNA izolasyonu Zymo Research Direct-zol RNA MiniPrep kit kullanılarak üretici protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Hücreler üzerindeki besiyeri çekildi ve hücreler 2 ml PBS (-20°C) ile hücreler yıkandı. Daha sonra flaska 2.5ml trizol eklendi ve 2 dakika beklendi. Hücreler scraper ile kazınarak 15'lik falkona alındı. 950 µl kloroform eklenerek falkon alt üst edildi. Karışım 2ml'lik mikrosantrifüj tüplere geçirildi ve 2 dakika beklendi. 15.000 rpm'de 15 dakika boyunca +4°C'de tüpler santrifüjlendi. Sonrasında süpernatant alınarak yeni mikrosantrifüj tüplere geçirildi. Süpernatant miktarı pipet yardımıyla ölçülüp eşit miktarda etanol eklenip pipetaj yapıldı. Karışım spin kolonlara alınıp 14000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj sonunda alt tüpdeki maddeler uzaklaştırıldı. Santrifüj bittikten sonra 400 µl RNA Wash Buffer kolonlara eklendi. 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip alt faz uzaklaştırıldı. Örnekler 5 µl DNaz 1 ve 75 µl DNA Digestion Buffer karışımı eklendi. Totalde 80 µl'lik karışım 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 400 µl Direct-zol RNA PreWash kolona eklendi ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Direct-zol RNA PreWash eklenerek santrifüj işlemi tekrarlandı ve toplama tüpündeki atık uzaklaştırıldı. 700 µl RNA Wash Buffer kolona eklenerek 2 dakika 14000 rpm'de santrifüjlendi. Kolonlar yeni RNaz-free tüplerine aktarıldı. Spin kolonun tam ortasına gelecek şekilde 22 µl DNaz/RNaz free water eklendi. Tüplerin 14000 rpm'de 1 dakika santrifüjü sonrası elde edilen RNA'lar ependorf içine alındı.

### 3.2.15.6 İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyon Tayini

Ekstrakte edilen RNA'ların kalitesi ve miktarı Nanodrop UV-Vis Spektrofotomere (Thermo Scientific) kullanılarak ölçüldü. Bu amaçla, elde edilen RNA'ların absorbans değerleri 260 nm ve 280 nm'de ölçüldü. RNA 260 nm'de UV ışığını absorbe eder, ancak RNA örneklerinin saflığını değerlendirmek için proteinlerin 280 nm'deki absorbans değerlerinin de bilinmesi gerekir. A260 / 280 oranı, numunelerin saflığını temsil eder. RNA'nın A260 / 280 oranı yaklaşık 1.8 olmalıdır. Protein ve etken moleküllerde kontaminasyon varsa, A260 / 280 değeri 1.6'nın altında çıkacaktır ve A260 / 280 değeri 2'nin üzerinde RNA ile olası kontaminasyonu gösterir. [133]

### 3.2.15.7 cDNA sentezi

Yapılan bu çalışmada cDNA'lar SensiFAST cDNA sentez kiti kullanılarak sentezlendi. cDNA için kullanılan hazırlanan karışım Tablo 3.2'de verildi.

**Tablo 3. 2** cDNA sentez bileşenleri

Hacim	Hacim
Total RNA	15 µl
5x TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
<b>TOPLAM</b>	20 µl

Elde edilen RNA'lardan 15µl ve PCR tüpü içinde 5x TransAmp Buffer 4 µl eklendi. Ardından Reverse Transkriptaz enziminden 1µl karışıma eklenerek pipetajlandı. Elde edilen karışımdan cDNA sentezi polimeraz zincir reaksiyon (PCR) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. PCR cihazı Tablo 3.3'de gösterilen parametrelere ayarlandı. Sentezlenen cDNA örnekleri kantitatif PCR'da kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

**Tablo 3. 3** cDNA sentez reaksiyon protokolü

Sıcaklık(°C)	Zaman (dakika)
25°C	10
42°C	30
85°C	5
4°C	∞

### 3.2.15.8 Kantitatif eş zamanlı PCR

Tmz/Gen kombinasyonunun ve TmzGenNP'lerin U87MG insan glioblastoma hücre hattına 48 saatlik inkübasyon sonrası IC<sub>50</sub> değerlerine göre farklı dozlarda (75µg/ml ve 10 µg/ml) uygulanması sonucunda oluşan apoptotik etkilerinin gen düzeyinde belirlenmesi amacıyla Bax, Bcl-2, sitokrom-c, kaspaz-3, kaspaz-9, kaspaz-8 ve β-aktin, genlerinin ekspresyonları kantitatif eş zamanlı PCR (qRT-PCR) ile tayin edildi.

Kantitatif PCR'da kullanılmak üzere hedefe özel primerler Sentegen firması tarafından üretildi. Primerler üretici firmanın protokolüne uygun olarak DNaz/RNaz free water ile çözdürülüp 10µM konsantrasyonda stokları hazırlandı. Tablo 3.6'da verildiği gibi β-actin, Kaspaz-3, Kaspaz-9, Sitokrom-c, Bcl-2, Bax, Kaspaz-8 genleri kantitatif PCR'da kullanıldı. Elde edilen cDNA'lar qRT-PCR analizinde kullanılmak üzere 1:4 oranında seyreltilti. cDNA'lar, forward ve reverse primerler, SYBR green boyası ve dH<sub>2</sub>O Tablo 3.4'de belirtilen miktarlarda kullanılarak qRT-PCR analizi gerçekleştirildi. Kantitatif PCR'da ekspresyonuna bakılacak her bir gen için master mix ayrı ependorflarda hazırlanarak tüm kuyulara 18 µl master mix konuldu. Ardından kuyulara 2µl cDNA'lar eklendi. Örneklerin amplifikasyonu ön denatürasyon için 2 dakika 95°C'de, denatürasyon için 5 saniyede 95°C'de, primerlerin bağlanması için 10 saniye boyunca 63°C'de ve uzama için 15 saniyede 72°C'de olacak şekilde 40 döngü boyunca gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon koşulları Tablo 3.5'de özetlenmiştir.

**Tablo 3. 4** qRT-PCR analizinde kullanılan bileşenler ve miktarları

Kimyasal Adı	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu	Bir Reaksiyon için Kullanılan Miktar
SensiFAST SYBR Lo-Rox	2x	2x	10 µl
Forward Primer	100 µM	10 µM	0.8 µl
Reverse Primer	100 µM	10 µM	0.8 µl
cDNA	-	-	2 µl
dH2O	-	-	6.4 µl

**Tablo 3. 5** qRT-PCR reaksiyon koşulları

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



**Tablo 3. 6** qRT-PCR ile amplifikasyonu gerçekleştirilecek genlere ait oligonükleotid dizileri, ürün uzunluğu ve Tm değerleri

Gen Adı	Oligonükleotid primer dizisi	Ürün uzunluğu	Tm
B-actin <u>NM_001101.5</u>	F: ACAGAGCCTCGCCTTTGCC R: GATATCATCATCCATGGTGAGCTGG	70	62.91 61.15
Kaspaz-3 <u>NM_004346</u>	F: AGAGGGGATCGTTGTAGAAGTC R: ACAGTCCAGTTCTGTACCACG	81	60.6 61.4
Kaspaz-9 <u>NM_032996</u>	F: CTCAGACCAGAGATTCGCAAAC R: GCATTTCCCCTCAAACCTCTCAA	116	60.9 60.5
Sitokrom-c <u>NM_018947</u>	F: CTTTGGGCGGAAGACAGGTC R: TTATTGGCGGCTGTGTAAGAG	54	62.8 60.1
Bcl-2 <u>NM_000657</u>	F: GGTGGGGTCATGTGTGTGG R: CGGTTTCAGGTAAGTCTCAGTCATCC	89	62.6 61.8
Bax <u>NM_138763</u>	F: CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG R: CCAGCCCATGATGGTTCTGAT	155	62.1 61.9
Kaspaz-8 <u>NM_033356</u>	F: GTTGTGTGGGGTAATGACAATCT R: TCAAAGGTCGTGGTCAAAGCC	222	60.5 62.8

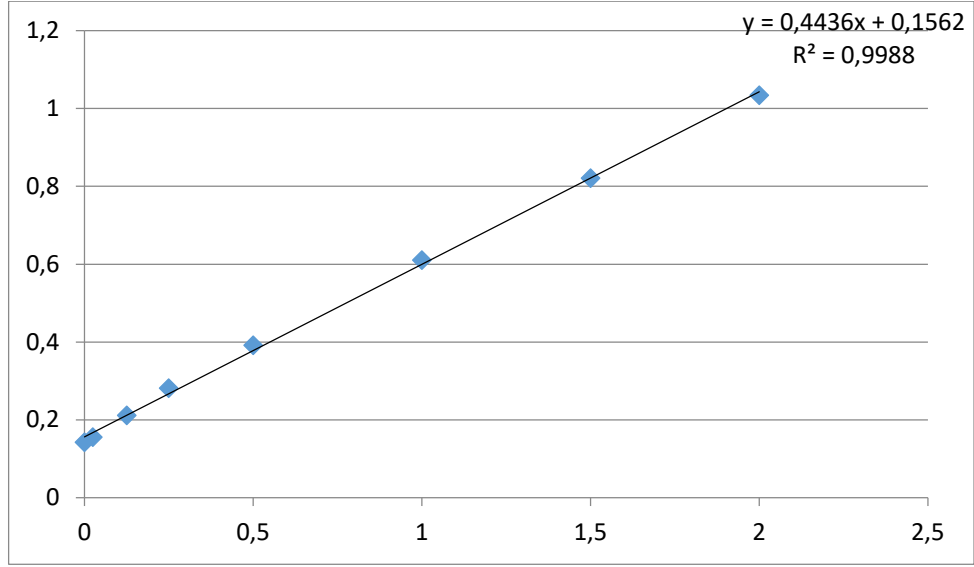
### 3.2.15.9 Protein Lizatlarının Hazırlanması

İnsan glioblastoma U87MG hücreleri T25 flaskı kaplayana kadar inkübe edildi. Hücrelere, TmzGenNP formülasyonu ve Tmz/Gen kombinasyonunun 48 saatlik IC<sub>50</sub> dozları uygulandı. İnkübasyon sonrasında hücrelerin üzerlerindeki besiyerleri çekildi ve hücreler PBS ile yıkandı. Hücreleri flasktan kaldırmak için Tripsin-EDTA

eklendi. Tripsin EDTA'yı inaktive etmek için flaska besiyeri eklendikten sonra hücreler 15 ml'lik falkon içerisine alınarak 5 dakika 1000 rpm'de santrifüjlendi. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılıp pellet 500 µl -20°C'daki PBS ile çözdürüldü. Falkon içindeki hücreler PBS ile çözüldükten sonra ependorflara alınıp 5 dakika 1000 rpm'de santrifüje bırakıldı. Aynı bir ependorf içerisinde proteaz fosfotaz inhibitöründen 10µl üzerine 1x RIPA çözeltisinden 1ml eklendi. Ardından santrifüjlenen pellet üzerine RIPA+ppi karışımından 500µl alarak pellet sıvı basıncı ile çözdürüldü. Çözünen pellet 15-20 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilip 5 dakikada bir vorteksledi. Örnekler 15000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant buz üzerinde temiz ependorflara alındı. Örnekler saklanmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

#### **3.2.15.10 Protein Miktar Ölçümü**

Örneklerin toplam protein konsantrasyonunun belirlenmesi, SDS-PAGE ile proteinlerin ayrılması sırasında her bir kuyucuğa eşit miktarda protein yüklemek için önemlidir. Reaktif olarak bikinkoninik asit yöntemi (BCA) kullanıldı. Alkali ortamdaki biüret reaktifi indirgenerek bakır katyonlarının BCA ile indirgenmesiyle spektrofotometrik olarak belirlendi. Bovine serum albumin (BSA) içeren standartlar (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) protein standart eğrisinin oluşturulması için hazırlandı. BSA standartları Tablo 3.7'de gösterilen şekilde seyreltildi ve protein standart eğrisi (Şekil 3.1) oluşturuldu. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi için örnekler 1:10 oranında seyreltilip 96 kuyucuklu plakalara kuyu başına 10 µl örnek olacak şekilde koyuldu. Her bir kuyuya 200 µl Working solution eklendi. Plaka 37°C'de 30 dakika boyunca etüvde inkübe edildi. 562 nm'de ELISA okuyucuda absorbans değerleri okundu. Her bir BSA standartından 562 nm'deki absorbanslarının standart eğrisi çizildi. Standart eğriden yararlanılarak test edilen örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi. Daha sonra SDS-PAGE analizinde kullanılmak üzere 1 mg/ml stok örnekler oluşturularak kullanılıncaya kadar 20°C'ye kaldırıldı.



**Şekil 3. 1** BSA standart eğrisi

**Tablo 3. 7** Protein standartlarının hazırlanması

Tüp	Konsantrasyon	BSA	dH <sub>2</sub> O
1	2 mg/ml	300 µl stok	-
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'ten	325 µl
5	0.25 mg/ml	325 µl tüp 4'ten	325 µl
6	0.125 mg/ml	325 µl tüp 5'ten	325 µl
7	0.025 mg/ml	100 µl tüp 6'dan	400 µl
8	0 mg/ml	-	400 µl

### 3.2.15.11 SDS-PAGE

BIO-RAD MiniPROTEAN® 3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılarak SDS-PAGE analizi gerçekleştirildi. %12'lik Ayırma jeli ve %4'lük Yükleme jeli hazırlanmadan önce jellerin döküleceği 1.5mm'lik camlar temizlendi ve apartlarına yerleştirilip standlarına yüklendi. %12'lik Ayırma jel karışımı bir beher içerisinde hazırlandıktan sonra camlar arasından pipet yardımıyla bırakıldı. Hava kabarcığı olmamasına dikkat edilip üst kısmının düz olması ve havayla temasını kesmek için üzeri su ile tamamlandı. Ardından ayırma jeli polimerleştiğinden emin olduktan sonra su dökülüp üzerine %4'lük Yükleme jeli döküldü ve hızlıca 15 kuyucuklu tarak yerleştirilerek polimerleşmeye bırakıldı. Yürütme tankı içerisine 1X tank tamponu sistemin belirlediği seviyeye kadar dolduruldu. Polimerleşen yükleme jeli taraklar yavaşça camdan destek alarak çekildi. SDS-PAGE yöntemi ile analiz edilecek örnekler 5 dakika boyunca 95°C'de kaynatıldı. PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Cat.No. 26619) markerından 3µl ilk kuyucuğa ardından sırasıyla örnekler kuyucuklara yüklendi. Sistem elektrotları güç kaynağındaki yerlerine takıldı ve örnekler önce 80V'da 30 dakika sonra 100 V'da 60 dakika olacak şekilde yürütüldü. Jelde boya cam tabanına ulaştığında güç kaynağı kapatılıp elektroforez uygulaması tamamlandı.

### 3.2.15.12 Western Blot

TmzGenNP formülasyonlarının ve Tmz/Gen kombinasyonunun uygulanan hücreler üzerindeki apoptozun içsel yolağında etkili olan ve bu süreçte mitokondriden sitoplazmaya salınarak kaspazların aktivasyonunu indükleyen sitokrom-c, cleaved kaspaz-9 ve kaspaz-3 genlerinin ekspresyonu Western Blot ile protein düzeyinde gösterildi. Yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanıldı.

SDS-PAGE jel elektroforezi ile proteinler ayrıldıktan sonra, iki cam dikkatlice ayrılarak jel çıkarıldı ve yükleme jel kısmı uzaklaştırıldı. Nitroselüloz membran, filtre kağıdı boyutunda kesildi. Transfer kasetinin içerisinde en altına transfer tamponu ile ıslatılan filtreye kağıdı daha sonra sırayla nitroselüloz membran, jel ardından tekrar filtre kağıdı olacak şekilde konuldu. Transfer rezervuarına kaset

doğru bir Şekilde yerleştirilip, 25V'da 1.3 A'de 7 dakika boyunca transfer gerŐekleŐtirildi. Bu işlem sonunda, membran dikkatlice kasetten ayrıldı ve %5'lik yağsız süt tozu iÇerisinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloklama yapıldı. Bloklama sonunda membran, %5'lik süt tozu iÇerisinde seyreltilen  $\beta$ -actin (1:1000), sitokrom-c (1:1000), kaspaz-3 (1:250) ve cleaved kaspaz-9 (1:500) primer antikorları kullanılarak, bir gece boyunca +4°C'de çalkalayıcı da inkübe edildi. İŐaretlemeden sonra membranlar üzerindeki primer antikorlar toplandı. Membranlar, PBS-Tween 20 ile 3'er kez 5 dakika yıkandılar. Yıkama iŐleminden sonra, %5'lik yağsız süt tozu iÇerisinde seyreltilen  $\beta$ -actin, kaspaz-3, cleaved kaspaz-9 iÇin anti-rabbit sekonder antikor (1:10000) ve sitokrom-c iÇin anti-mouse sekonder antikor (1:10000) hazırlanıp membran üzerine aktarıldı. Sekonder antikolarla 1 saat boyunca oda sıcaklığında iŐaretlemeleleri yapılan membranlar tekrar PBS-Tween 20 ile 5 dakika boyunca 3'er kez yıkandı. Membranlar, hazırlanan kolorimetrik deteksiyon çözeltisine iÇinde tutularak bant oluşumu gözlemlendi. Bant oluŐtuktan sonra membran distile su iÇerisine alındı.

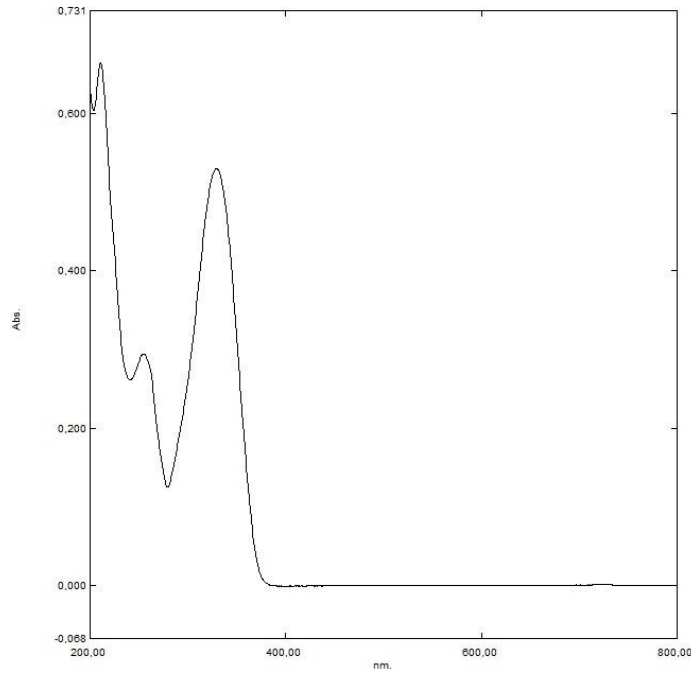
#### **3.2.15.13 İstatiksel Analizler**

ArdıŐık 3 kez tekrarlanan deneylere ait ölçüm sonuçları alınarak ortalama ve  $\pm$  SD değerleri hesaplanmıştır. TmzGenNP'lerin, Tmz ve Gen serbest ve Tmz/Gen kombinasyonunun eğrileri, Graphpad Prism 8.4.3 istatistik yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Kontrol ve deney grupları arasında anlamlı farklılık olup olmadığı Graphpad Prism 8.4.3 istatistik yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir ve  $p < 0.05$  değerleri anlamlı sayılmıŐtır.

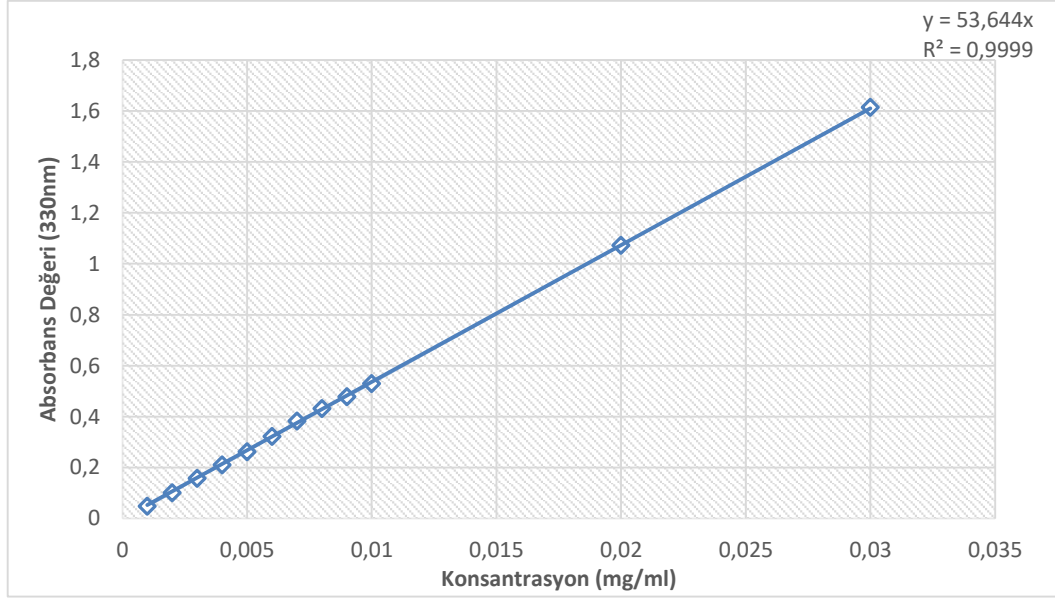
## 4.1 Temozolomid ve Genistein Moleküllerine Ait UV-Vis Spektrumları ve Kalibrasyon Eğrileri

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

1 mg temozolomid 10 ml distile suda çözdürülerek 0.1 mg/ml oranında çözelti elde edildi. Bu çözeltilerden, 0.01 mg/ml ile 0.009 mg/ml değerleri aralığında seyreltilen konsantrasyonların UV spektrofotometrede şiddetleri ölçüldü ve böylelikle temozolomidin absorbans verdiği dalga boyu 330 nm olarak tespit edildi. Farklı konsantrasyonlardaki temozolomid çözeltilerinin UV absorbans değerleriyle kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Temozolomidin distile suya karşı 330 nm UV absorbans değerindeki piki Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda temozolomid kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



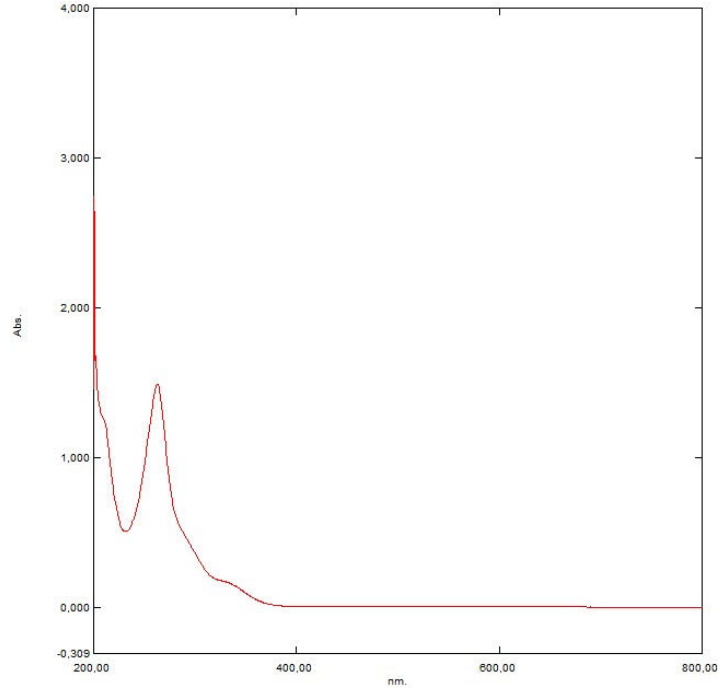
Şekil 4. 1 Temozolomid molekülüne ait UV-Vis Spektrumu



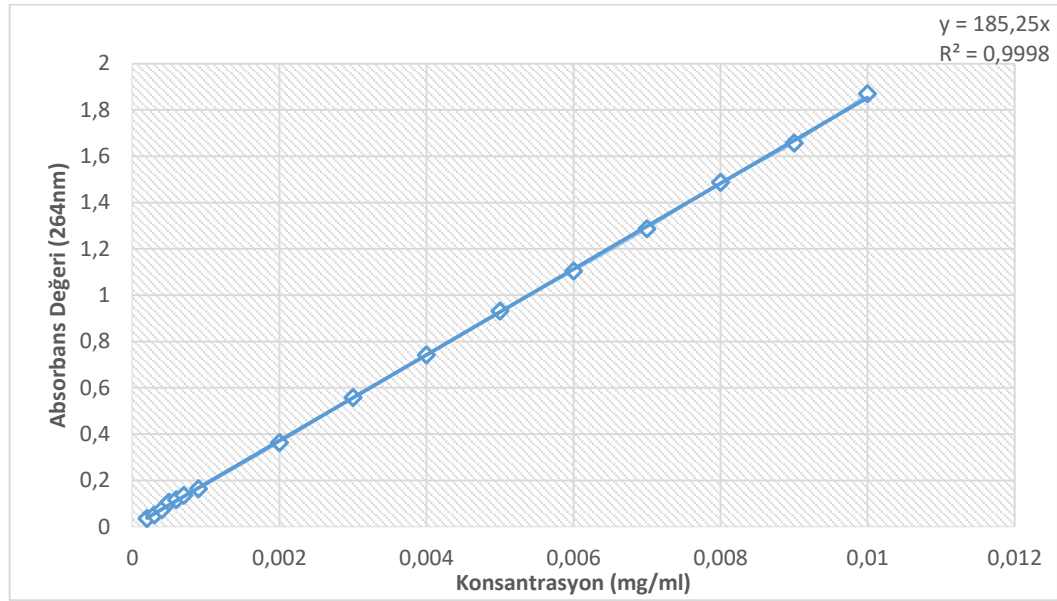
**Şekil 4. 2** Temozolomid molekülüne ait kalibrasyon eğrisi

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

1 mg genistein molekülü 10 ml etanol ile çözdürülerek 0.1 mg/ml oranında çözelti hazırlandı. Bu hazırlanan genistein çözeltisi seyreltilerek 0.01 mg/ml ile 0.0002 mg/ml aralığında farklı konsantrasyonlarda genistein çözeltileri elde edildi. Genistein molekülünün UV spektrofotometrik analizi sonrası pik verdiği absorbans değeri 264 nm olarak dalga boyu olarak belirlendi. Farklı konsantrasyonlardaki genistein çözeltilerinin UV absorbans değerlerin ile kalibrasyon eğrisi çizildi. Şekil 4.3'te genisteinin etanole karşı 264 nm'de UV spektrumuna ait şiddeti verilmiştir. Şekil 4.4'de ise farklı konsantrasyonlardaki genistein çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi gösterilmektedir.



**Şekil 4. 3** Genistein molekülüne ait UV-Vis Spektrumu



**Şekil 4. 4** Genistein molekülüne ait kalibrasyon eğrisi

## 4.2 Temozolomid/Genistein Yüklü Nanopartiküllerin Sentezi

Tez çalışması kapsamında temozolomid ve genistein etken molekülleri nanopartikül formülasyonları tekli emülsiyon (o/w) çözücü uçurma yöntemi



kullanılarak hazırlanmıştır. Bunun nedeni, temozolomidin hidrofilik özellikte olup genistein molekülünün ise hidrofobik özellik göstermesidir. Etken madde içermeyen boş PLGA nanopartikülü de kontrol amacıyla üretilmiştir. Bu çalışmada nanopartikül üretimi için kullanılan PLGA polimeri, FDA onaylı, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir bir sentetik polimer olmasının yanı sıra uygun degradasyon özelliklerine sahip ve kontrollü ilaç salım imkanı sağlayabilen bir polimerdir. Nanopartikül üretim çalışması için PLGA'nın tercih edilmesinin bir diğer nedeni de polimer ilaç matrisinin fiziksel özellikleri polimerin moleküler ağırlığı, laktid/glikolid oranı ve polimerik yapı içerisine yüklenen ilaç konsantrasyonlarının ayarlanmasıdır [126, 134].

Farklı parametreler ile temozolomid (TmzNP1, TmzNP2), genistein (GenNP), temozolomid-genistein (TmzGenNP) yüklü ve boş PLGA (BosNP) nanopartiküller sentezlenmiştir. Temozolomid yüklü nanopartiküllerin sentezinde iki farklı PLGA miktarı kullanılmıştır. 25mg PLGA ile sentezlenen temozolomid partikülü ilaç yükleme kapasitesi 100 mg içerisine enkapsüle edilen temozolomide oranla düşük olmuştur. Bu yüzden 100 mg PLGA ile optimize genistein ve temozolomid-genistein nanopartikülleri sentezlenmiştir.

1'er mg etken madde miktarları kullanılarak temozolomid-genistein etken maddeleri 1:1 oranında 100 mg PLGA içine enkapsüle edilmiştir. Temozolomid ve genisteinin çözücü miktarları Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Etken moleküllerin çözüldüğü etanol ve distile su miktarları artırılarak homojen bir çözelti oluşturulmuştur. Nanopartikül stabilizasyonunu sağlamak amacıyla iç faz için %3'lük 4 ml PVA, dış faz için ise % 0.1'lik 35 ml PVA kullanılmıştır. Sonikatörde 90 sn boyunca 80 W'de sonikasyon yapılmıştır. Tablo 4.1'de nanopartikül üretiminde optimize edilen parametreler gösterilmiştir.

**Tablo 4. 1** Nanopartikül optimizasyon parametreleri

NP Adı	Gen (mg)	Tmz (mg)	PLGA (mg)	PVA (ml) İç faz	PVA(%) İç faz	PVA (ml) Dış faz	PVA(%) Dış faz	Sonikasyon süresi (sn) ve gücü (W)
BoşNP	-	-	100	4	3	35	0.1	90 sn 80W
TmzNP1	-	1	25	4	3	35	0.1	90 sn 80W
GenNP	1	-	100	4	3	35	0.1	90 sn 80W
TmzNP2	-	1	100	4	3	35	0.1	90 sn 80W
TmzGenNP	1	1	100	4	3	35	0.1	90 sn 80W

### 4.3 Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Etken Madde Yüklenme Verimi

Enkapsüle edilen nanopartiküllerin boyut dağılımı, reaksiyon verimi, zeta potansiyeli, çoklu dağılım indeksleri ve enkapsülasyon etkinlikleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

**Tablo 4. 2** Üretilen nanopartiküllerin fiziko-kimyasal karakterizasyon sonuçları

NP Adı	Boyut Z-ave (nm)	Çoklu Dağılım İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyeli (mV)	Reaksiyon Verimi (%) (RV)	Enkapsülasyon Etkinliği (%) (EE)	
					Gen	TMZ
BoşNP	167,9±8,743	0,199±0,075	-22,8±0,379	-	-	-
TmzNP1	145,9±3,045	0,229±0,019	-36,4±3,02	0,97	-	6,3
GenNP	180,7±3,002	0,164±0,014	-35,8±0,346	56,63	42	-
TmzNP2	165,8±3,201	0,113±0,013	-34,3±2,28	43,56	-	25,3
TmzGenNP	135,5±4,763	0,139±0,010	-33,7±0,866	34,30	30	38

#### 4.3.1 Reaksiyon Verimi

Tablo 4.2’de verildiği gibi nanopartiküllerin reaksiyon verimleri 3.1, 3.2 ve 3.3 eşitlikleri kullanılarak hesaplanmıştır. 1 mg temozolomid ve 25 mg PLGA ile hazırlanan TmzNP1 nanopartikülünün reaksiyon verimi %0.97 olarak ve 100 mg PLGA kullanılarak üretilen TmzNP2’nin reaksiyon verimi ise %43.56 olarak tespit edilmiştir. PLGA miktarının artmasının reaksiyon verimini arttırdığı gözlemlenmiştir. 1 mg genistenin 100 mg PLGA’ya enkapsüle edilmesiyle elde edilen GenNP’nin reaksiyon verimi ise %56.63 olarak bulunmuştur. 1 mg temozolomid ile 1 mg genistein etken molekülleri ve 100 mg PLGA kullanılarak oluşturulan TmzGenNP’nin reaksiyon verimi %34.30 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar PLGA miktarının reaksiyon verimi üzerinde etkisinin yüksek olduğunu doğrulamaktadır [135, 136].

#### 4.3.2 Enkapsülasyon Etkinliği

Nanopartikül içerisine yüklenen etken madde miktarı, santrifüj sonrası elde edilen üst fazların konstantrasyonlarının tespit edilmesiyle hesaplanmıştır. Eşitlik 3.7, 3.8 ve 3.9 kullanılarak TmzNP, GenNP, TmzGenNP’ye enkapsüle edilen maddelerin miktarları Tablo 4.2’de gösterilmiştir. TmzNP1 nanopartikülünün enkapsülasyon etkinliği %6.3, TmzNP2 nanopartikülünün ise %25.3 olarak bulunmuştur. PLGA miktarının enkapsülasyon etkinliği üzerinde etkisinin olduğu görülmüştür. GenNP nanopartikülünün enkapsülasyon etkinliği %42 olarak hesaplanmıştır. Temozolomid ve genistein etken moleküllerinin birlikte bulunduğu TmzGenNP nanopartikülünde ise, temozolomid için enkapsülasyon etkinliği %38, genistein için enkapsülasyon etkinliği ise %30 olarak bulunmuştur.

Literatürde temozolomidin enkapsülasyon veriminin düşüklüğünün, düşük çözünürlük ile orantılı olduğu bildirilmiştir. Bu sorunun başlangıç temozolomid miktarında yapılacak değişikliklerle giderilebileceği rapor edilmekle beraber, enkapsülasyon veriminin artırabilmesi için temozolomid miktarının artırılması gerektiği önerilmiştir. Ayrıca temozolomidin düşük enkapsülasyon etkinliğinin

nedeninin yüksek yüzey alanı-toplam hacim oranı nedeniyle nanopartiküldeki ilacın daha fazla difüzyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. [137, 138].

Genisteinin enkapsülleme etkinliğinin literatürle benzer sonuçlarda olduğunu ve genistenin hidrofobik yapısının nanopartikül içerisine enkapsüle edildiğinde suda çözünürlüğünü, hücresel alımını, biyoyararlanımını artırdığı görülmüştür [139, 140]. Enkapsülasyon etkinliği, etken moleküllerin hem PLGA çekirdeğinde hem de lipid katmanında kapsüllemesi, moleküllerin aşamalı bir şekilde salınmasına izin vermekte bu da toksisitenin azaltılmasıyla gelişmiş terapötik indeks sağlamaktadır [141].

### **4.3.3 Etken Madde Yüklenme Verimi**

Nanopartikülün içerisine yüklenen madde miktarını bulmak için etken madde yükleme verimleri 3.4, 3.5 ve 3.6'da olduğu gibi hesaplanarak Tablo 4.2'de verildiği gibi bulunmuştur. TmzNP1 nanopartikülünün etken madde yükleme verimi %3.5 iken TmzNP2 nanopartikülünün etken madde yükleme verimi %0.59 olarak bulunmuştur. GenNP nanopartikülünün içindeki madde miktarı %0.71 olarak hesaplanmıştır. Temozolomid ve genisteinin birlikte bulunduğu TmzGenNP etken madde yükleme verimi %1.80 olarak belirlenmiştir.

İlaç yükleme miktarı, moleküler ağırlık ve kopolimerin monomer oranı, ilaç salım hızı ve modelini etkileyen başlıca faktörlerden biridir. Araştırmacılar tarafından, yüksek oranda hidrofilik ilaçların, polimer ile düşük afinite problemlerinden muzdarip olduğu ve bunun tatmin edici olmayan bir yükleme verimliliğine yol açtığı ortaya koyulmuştur [142].

Literatürde genisteinin etken madde yükleme verimi bulduğumuz sonuçlar ile paralellik göstermektedir [143]. Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan nanopartikül temozolomidin düşük yüklenme verimliliği olduğu gözlemlenmiştir [144]. Nanopartikül oluşumu sırasında hidrofilik temozolomidin organik fazdan sulu faza hızlı difüzyonu, bu zayıf kapsülleme ve yükleme verimliliğini açıklamaktadır [137, 145].

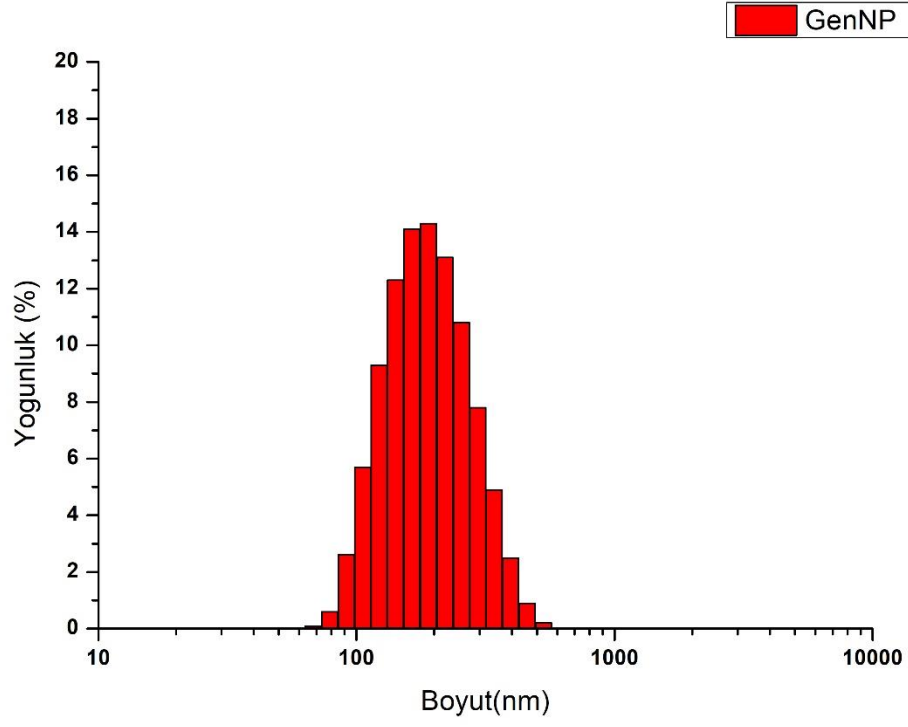
## 4.4 Temozolomid/Genistein Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

### 4.4.1 Nanopartiküllerin Boyut Analizi ve Çoklu Dağılım İndeksleri

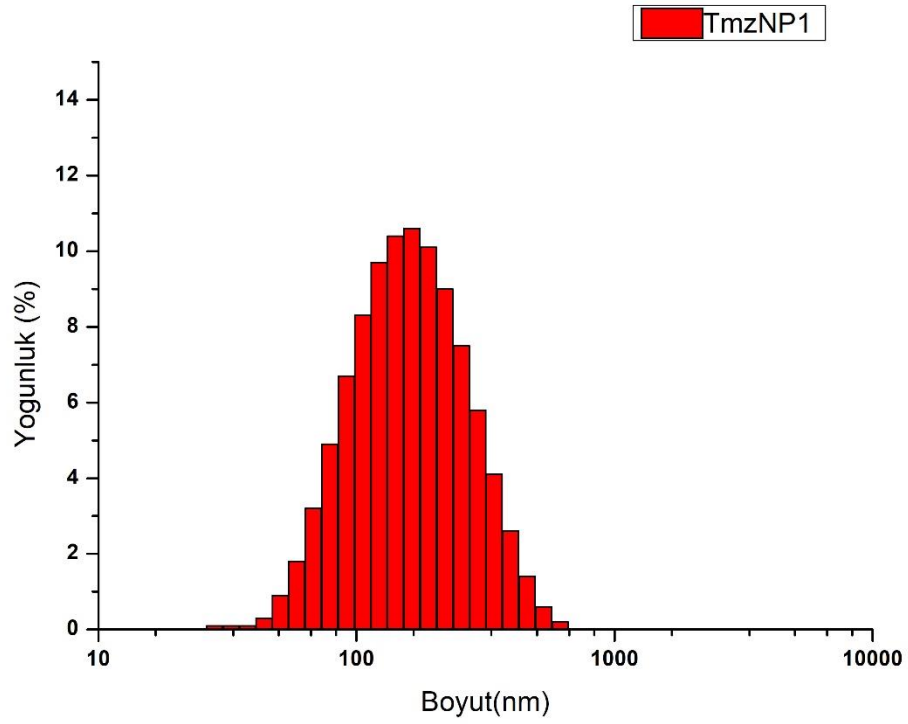
Tablo 4.2’de TmzNP1, TmzNP2, GenNP, TmzGenNP nanopartiküllerinin boyut analizi ve çoklu dağılım indeksleri (PDI) verilmiştir. Boyut analizi ve çoklu dağılım indeksleri Zetasizer Nano Z cihazı kullanılarak 3 tekrarlı olarak elde edilmiştir. TmzNP1’ nin (Şekil 4.6) ortalama boyutu  $145,9 \pm 3,045$  nm, TmzNP2’nin (Şekil 4.7) ortalama boyutu  $165,8 \pm 3,201$  nm, GenNP’nin ortalama boyutu (Şekil 4.5)  $180,7 \pm 3,002$  nm, TmzGenNP’nin ortalama boyutu (Şekil 4.8) ise  $135,5 \pm 4,763$  nm olarak belirlenmiştir. Üretilen nanopartiküller arasında, ikili enkapsülasyonun gerçekleştirildiği TmzGenNP en dar boyut dağılımına ve en küçük boyutlara sahip nanopartikül formülasyonu olarak bulunmuştur.

Çoklu dağılım indeksleri (PDI), TmzNP1 için  $0,229 \pm 0,019$ , TmzNP2 için  $0,113 \pm 0,013$ , Gen NP için  $0,164 \pm 0,014$  ve TmzGenNP nanopartikülü için ise  $0,139 \pm 0,010$  olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2). Nanopartiküllerin çoklu dağılım indeksleri (PDI) incelendiğinde, dar ve homojen bir dağılım gösterdikleri tespit edilmiştir.

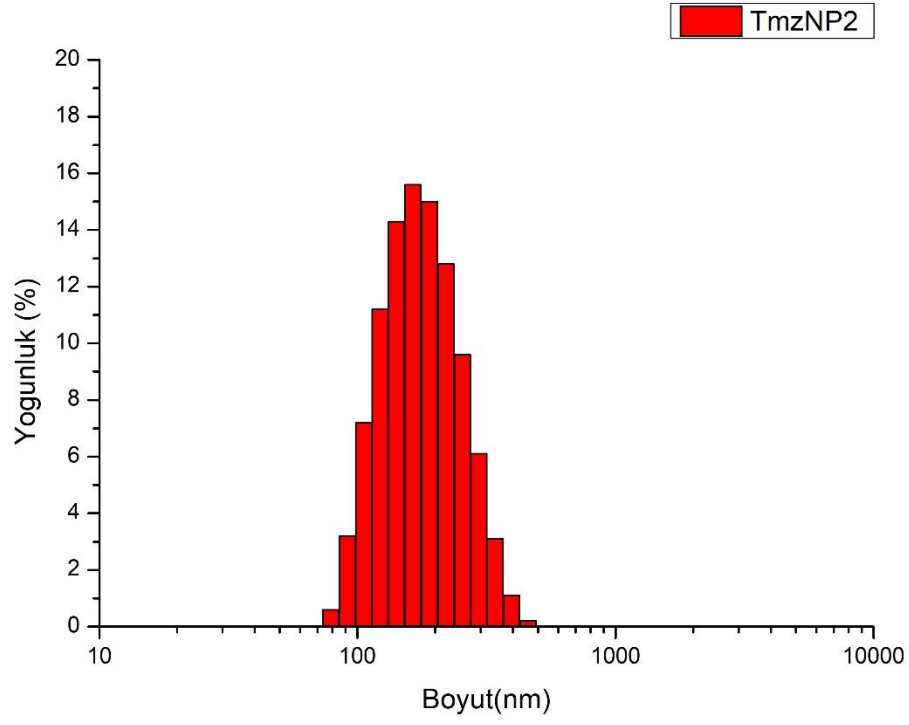
Glioblastomada en önemli sorunlardan biri olan kan-beyin bariyeri (KBB), eksojen materyallerin, bakterilerin, virüslerin ve kemoterapötik ajanların girişine izin vermeyen endotel hücrelerinden oluşan yapıdır. Ayrıca KBB hidrofobik olan küçük boyutlu yapıların (200 nm'nin altında) geçişine izin verir dolayısıyla partikül boyutu, KBB aşmayı amaçlayan kemoterapötik ajanlar için önemli bir parametredir. Elde edilen sonuçlar üretilen nanopartiküllerin glioblastomada önemli bir engel olan KBB bariyerinden geçiş için bir sorun teşkil etmediğini göstermektedir [146, 147].



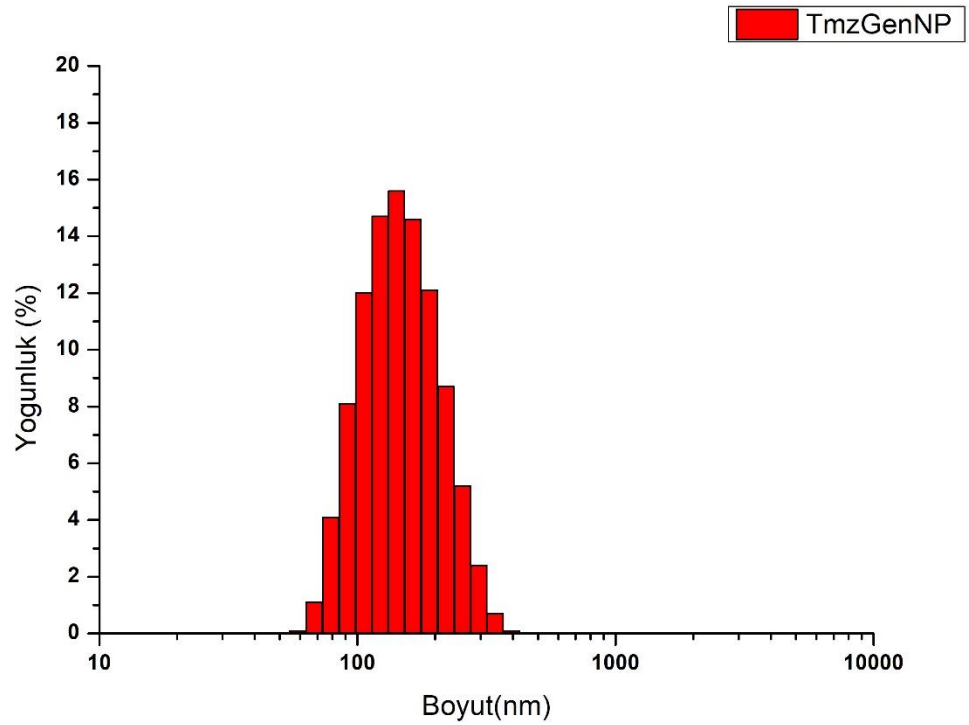
Şekil 4. 5 GenNP ait boyut dağılım analizi



Şekil 4. 6 TmzNP1 ait boyut dağılım analizi



Şekil 4. 7 TmzNP2 ait boyut dağılım analizi

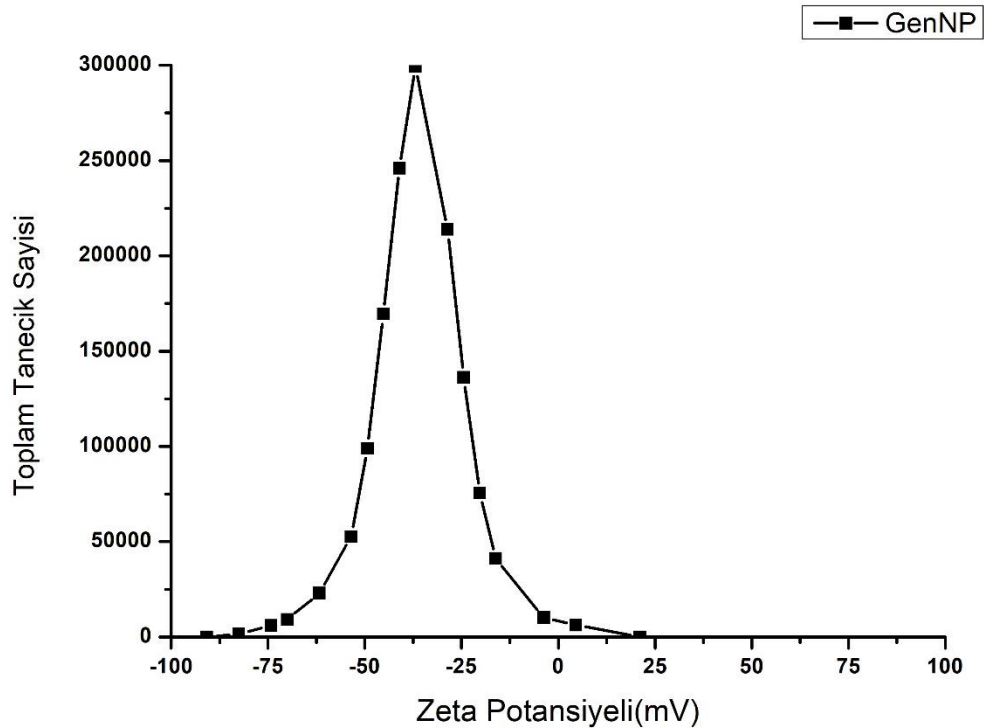


Şekil 4. 8 TmzGenNP ait boyut dağılım analizi

#### 4.4.2 Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Analizi

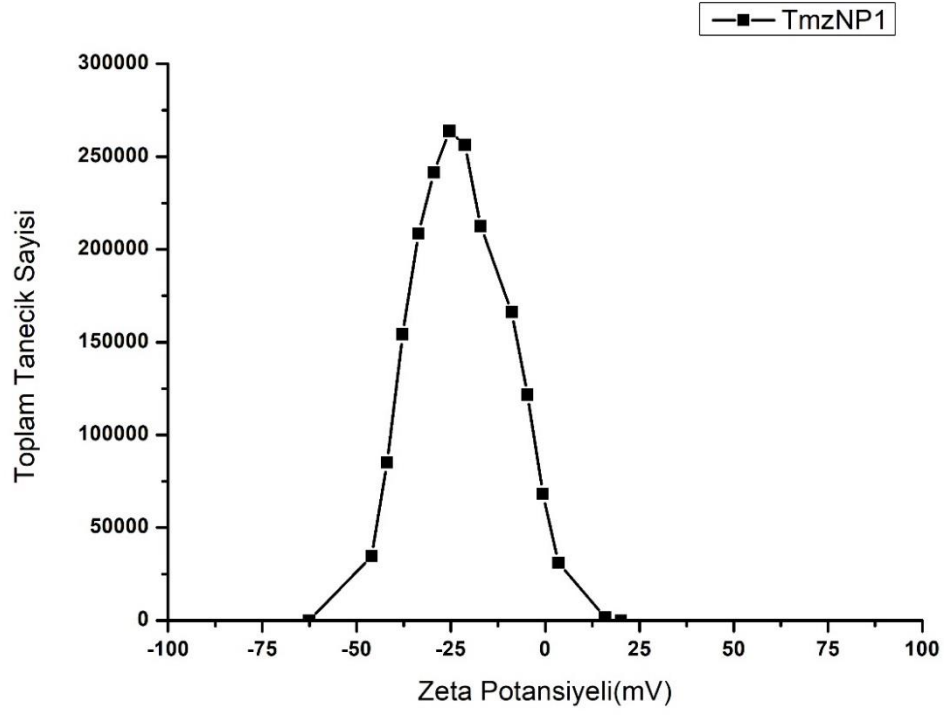
Üretilen nanopartiküllerin zeta potansiyelleri Zetasizer Nano Z cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Zeta potansiyelleri sırasıyla; TmzNP1'in (Şekil 4.10)  $-36,4 \pm 3,02$  mV, TmzNP2'nin (Şekil 4.11)  $-34,3 \pm 2,28$  mV, GenNP'nin (Şekil 4.9)  $-35,8 \pm 0,346$  mV ve TmzGenNP'nin (Şekil 4.12) ise  $-33,7 \pm 0,866$  mV olarak belirlenmiştir.

Nanopartikül yüzeyi, ilaç dağıtımını hedeflemede önemli bir özelliktir [148]. PLGA'nın yüzey modifikasyonu, parçacık boyutu ile etken molekülerin ağırlığı hazırlanan nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerini ve kapsüllenmiş moleküllerin etkisini güçlü bir şekilde etkiler. Tüm nanopartiküller büyük bir negatif veya pozitif zeta potansiyeline sahipse birbirlerini iter böylece nanopartikül yükü neredeyse nötr olduğunda daha yüksek kararlılığa neden olur [149]. Kocbek ve arkadaşları, monoklonal antikor ile modifiye edilmiş PLGA nanopartiküllerinin ortalama zeta potansiyelini  $-25$  mV olarak hesaplamıştır. Bu da polimerin bazı serbest karboksilik uç gruplarının nanopartiküllerin yüzeyinde bulunduğunu göstermiştir [150].

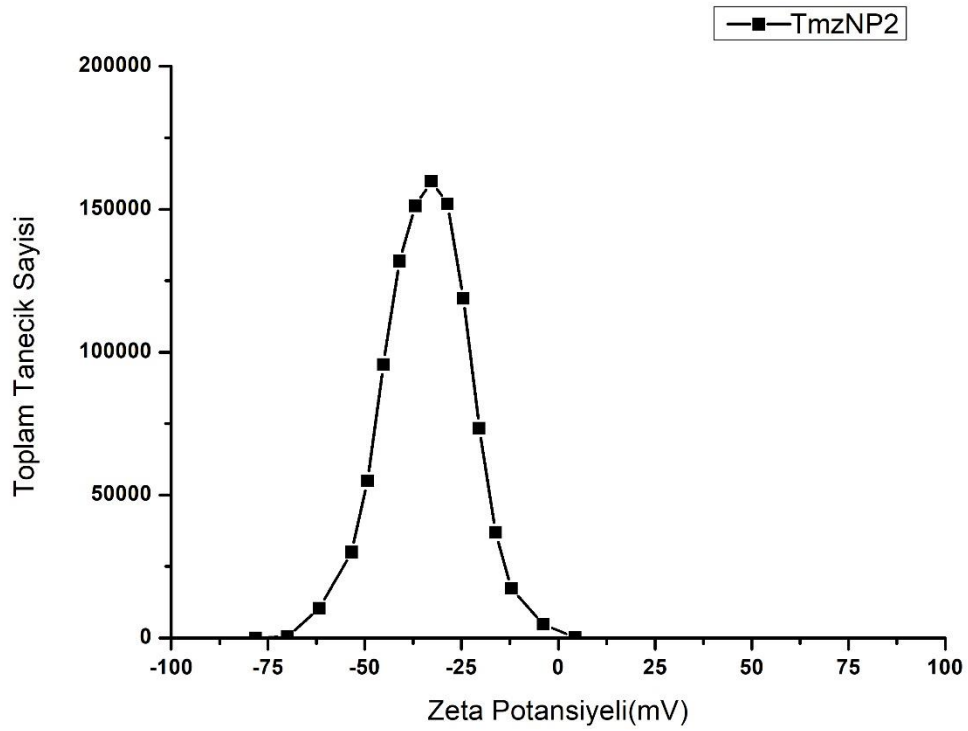


Şekil 4. 9 GenNP'ye ait zeta potansiyel grafiği

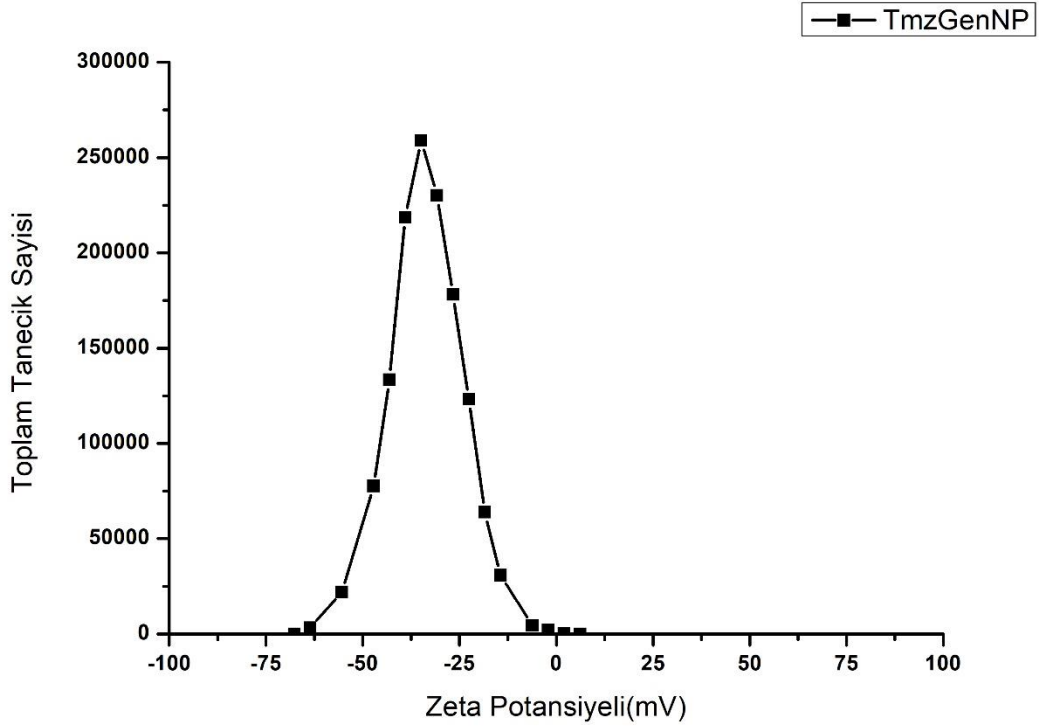




Şekil 4. 10 TmzNP1'e ait zeta potansiyel grafiği



Şekil 4. 11 TmzNP2'ye ait zeta potansiyel grafiği



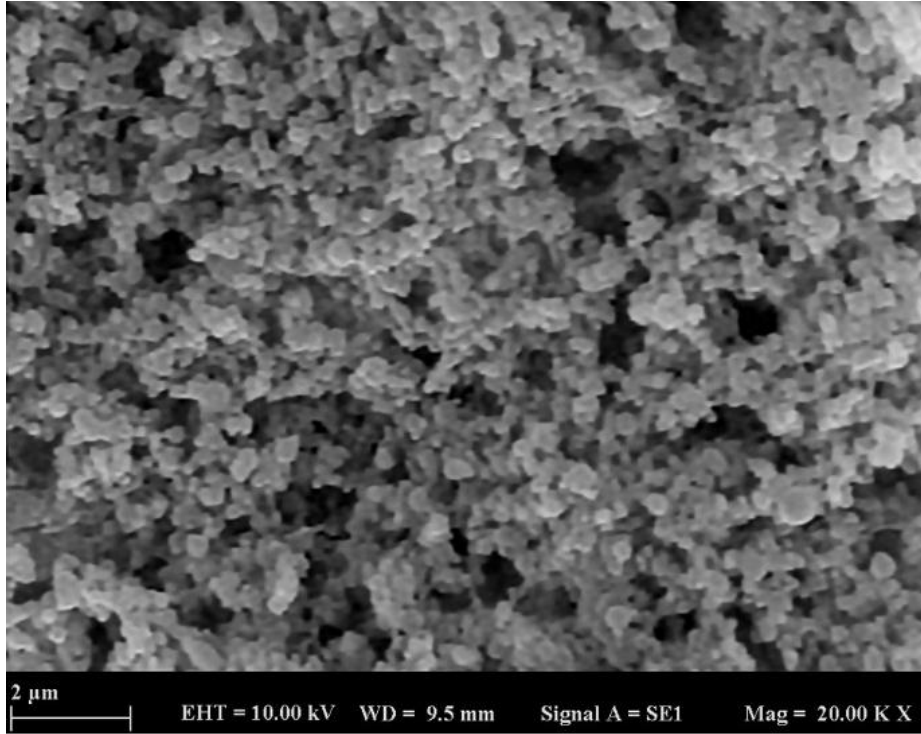
Şekil 4. 12 TmzGenNP'ye ait zeta potansiyel grafiği

#### 4.4.3 Nanopartiküllerin Morfolojik İncelemesi

Nanopartiküllerin yüzey morfolojisini değerlendirmek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Nanopartikül numuneleri Au ile kaplanmıştır ve 10.00 kV hızlanma gerilimi altında 20.000x büyütmede SEM görüntüleri alınmıştır. Elde edilen sonuçlar, polimerik nanopartiküllerin homojen ve küresel bir yapıda olduğu bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında SEM analizi nanopartiküllerin boyutunu ve morfolojisini karakterize etmek için kullanılmıştır. İlaç taşıyıcı sistemleri, serbest kan dolaşımından sonra doğrudan hücresel hedeflere bağlanan ilaçlara göre başlıca avantajları, ilaç sistemik toksisitesindeki azalmanın yanı sıra, biyolojik aktivitelerini etkilemeden hedef bölgedeki (hücre zarları boyunca endositozdan sonra) etkili ilaç konsantrasyonlarının verilmesidir. PLGA gibi polimerik nanopartiküller, ilacın dağıtıldığı polimer matriksin bozunmasını ve erozyonunu kontrol ederek ilaçların sürekli ve kontrollü salımını teşvik etme özelliğine sahiptir. Literatürde farklı prosedürlerle hazırlanan (Tekli-çiftli emülsiyon çözücü

uçurma metodu) temozolomid yukl PLGA nanopartiküllerinin de küresel şekilde ve  $\leq 200$  nm boyutunda olduğu gözlemlenmiştir [137]. Genistein için ise PLGA-TPGS nanopartikülüne enkapsüle edilerek nanopartikülün neredeyse küresel bir ekle sahip olduğu ve ortalama partikül boyutunun yaklaşık 250 nm olduğu bulunmuştur [151]. Bu alışma ile üretilen nanopartikül sistemlerinin de boyut özelliklerinin literatür ile uyumlu olduğu gösterilmiştir.



**şekil 4. 13** TmzGenNP'nin 20.000x büyütme oranı ile çekilmiş SEM görüntüsü

#### 4.4.4 Nanopartiküllerin FT-IR Analizi

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizi ile üretilen nanopartiküllerin yüzeyindeki fonksiyonel grupların tayini, böylelikle etken maddelerin nanopartikül ile etkileşiminin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

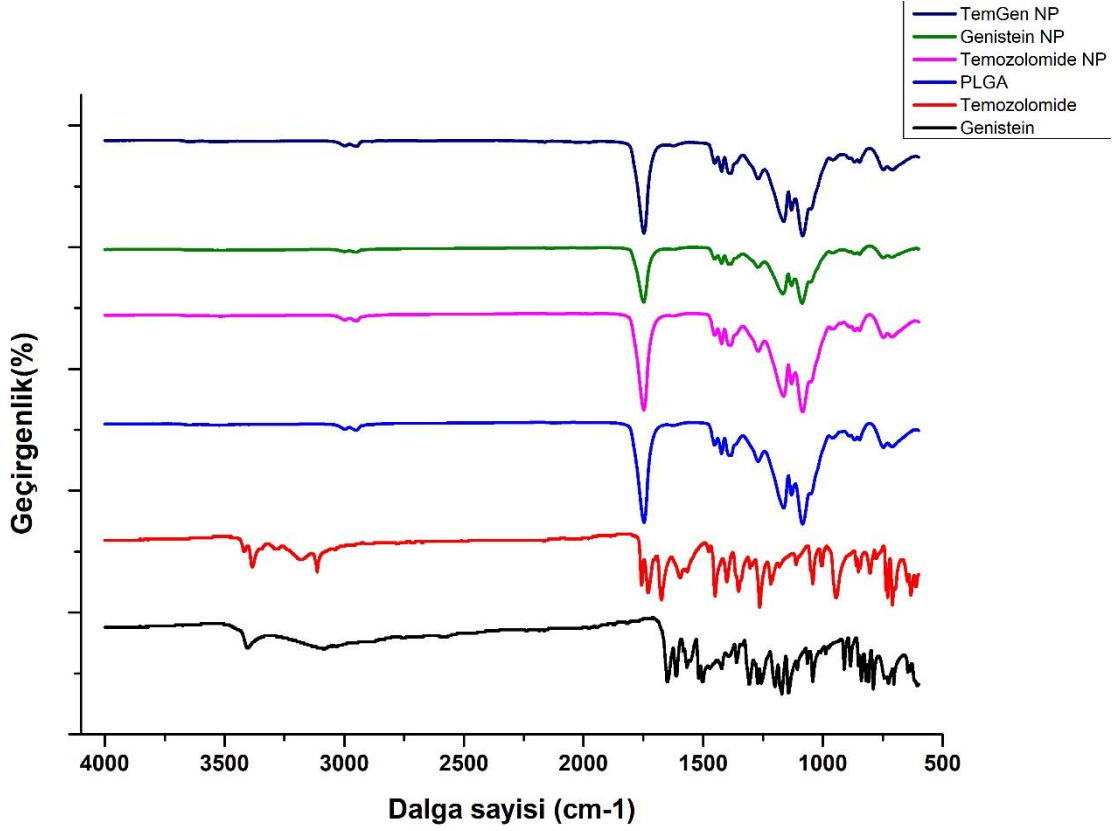
şekil 4.14'te çalışmada kullanılan etken maddeler, PLGA ve üretilen nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu gösterilmiştir. Genistein molekülü, çeşitli karakteristik tepe noktaları göstermiştir (şekil 4.14). En belirgin olanları O – H ve C – H grupları sırasıyla  $3404\text{ cm}^{-1}$  ve  $3080\text{ cm}^{-1}$ 'dir. C-O gruplarına denk gelen

1650  $\text{cm}^{-1}$ 'de, -C = C- gruplarına 1615  $\text{cm}^{-1}$ 'de, C - O - C 1320-1150  $\text{cm}^{-1}$  pik göstermektedir [152].

Şekil 4.14'te GenNP, TmzNP ve TmzGenNP'ye ait FT-IR spektrumları incelendiğinde ise PLGA polimerine karakteristik piklerin bulunmadığı, dolayısıyla etken maddelerin PLGA içine başarı ile enkapsüle edildikleri gözlemlenmektedir. Bununla birlikte, GenNP nanopartikülüne ait FT-IR spektrumunda ise düşük miktarda genistein molekülüne ait bir bant gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).

Temozolomid molekülünün FT-IR spektrumu incelendiğinde, 3453 $\text{cm}^{-1}$  ila 3330  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bantlar, N-H titreşiminin varlığını amid ve amin gruplarından da gösterir. 1721  $\text{cm}^{-1}$  C = O grubunu, 1651, 1630 ve 1601  $\text{cm}^{-1}$ 'deki bantlar N-H ve C = N gruplarını gösterir [153].

Üretilen tüm nanopartiküllerde PLGA'ya spesifik olan 3000-2950  $\text{cm}^{-1}$ 'deki asimetric gerilmenin olduğu ve tepe noktasının 1750  $\text{cm}^{-1}$ 'da pik verdiği gösterilmiştir (Şekil 4.14) PLGA karakteristik özelliğinde olduğunu ve temozolomidi içine hapsediği gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 14 Temozolomid, Genistein, PLGA TmzNP, GenNP ve TmzGenNP'ye ait FT-IR spektrumları

#### 4.5 Nanopartiküllerin In Vitro Salım Analizi

Sentezlenen nanopartikül PBS (pH:7.4) süspanse edilerek 37°C'de yatay bir şekilde çalkalanarak salım deneyi 30 gün boyunca kontrol edilmiştir. Örnekler belirli aralıklar ile 1000 rpm'de santrifüjlenip UV-spektrofotometrede ölçümleri alınmıştır. Buna bağlı olarak temozolomid-genistein yüklü polimerik nanopartikülün salım grafikleri çizilmiştir. TmzGenNP'nin 30 gün boyunca gösterdiği salım davranışı Şekil 4.15'de gösterilmiştir.

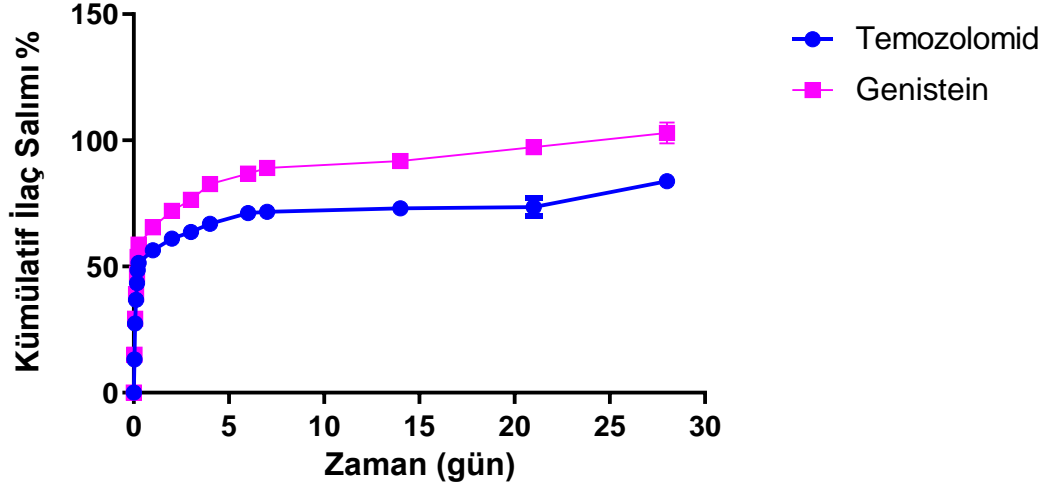
Nanopartikül sistemlerinden in vitro ilaç salımında partikülün boyutu ile salım ters orantı göstermektedir. Boyut olarak büyük olan nanopartiküller daha yavaş salım gösterirken, boyutu küçük nanopartiküller büyük yüzey alanına sahip olduklarından dolayı daha ani salım gerçekleştirirler. Bu durum, ilaç salımının

başlangıcında “burst (patlama) etkisi” denilen hızlı bir şekilde partikülden etken madde salımı olarak ifade edilir. Belli bir eşikte partikülün yüzeyinde negatif karboksilat anyonu karboksilik asitle protonlandığında elektrostatik etkileşim zayıflar bu da patlama salımını ortaya çıkartır [154, 155].

TmzGenNP'ye ait salım grafiği incelendiğinde, ilk altı saatte temozolomidin %50,81'inin nanopartikülden salındığı, birinci günün sonunda %55,89'unun, ikinci günde ise %60,24'ünün salındığı belirlenmiştir. Bir hafta sonunda TmzGenNP'den salınan temozolomid miktarı %70,39'a çıkmış ve lineer bir salım profili gözlemlenmiştir. 30 günün sonunda ise TmzGenNP'den temozolomid salımı %82,73'e ulaşmıştır.

TmzGenNP'ye enkapsüle edilen diğer etken madde olan genisteinin, ilk 6 saatte %57,39 salım göstermiştir. 24 saat sonra salım oranını %64,13, 48 saat sonra ise salım oranı %71,02 olarak hesaplanmış, sonrasında nanopartikülden genistein salımı yavaşlayarak devam etmiştir. Nanopartikül lineer salımın ardından belli bir sürede denge profiline ulaşmıştır. 30. günün sonunda TmzGenNP'den genisteinin %100'ünün salımı tamamlanmıştır.

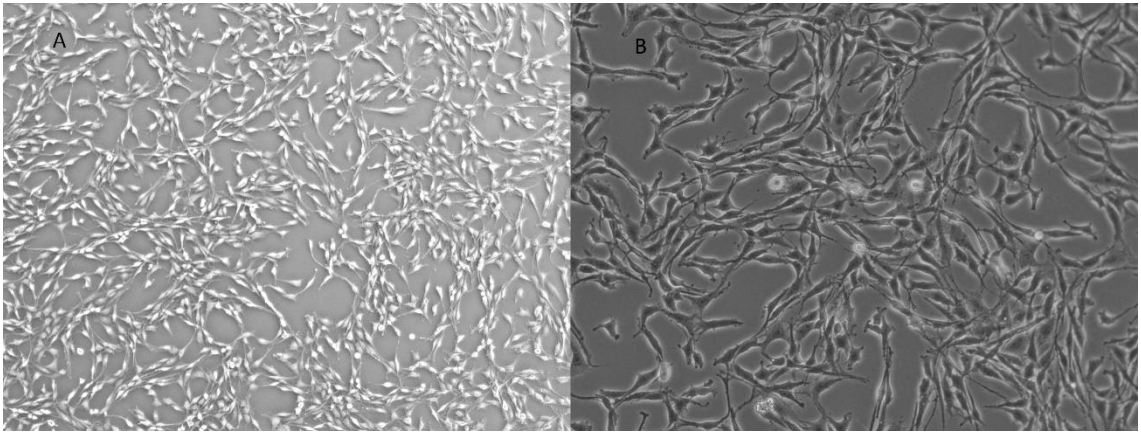
PLGA nanopartiküllere farklı etken maddelerin enkapsüle edilmesiyle yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar, bu tez çalışmasındaki bulgulara paralellik göstermektedir. Guihua Huang ve arkadaşlarının, yaptığı bir çalışmada katı-lipid nanopartikül içine enkapsüle edilen temozolomid'in %50'sinin 15 saatin sonunda salımının gerçekleştiği rapor edilmiştir. Benzer şekilde Xin-Hua Tian ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada ise polibutylsiyanoakrilat nanopartikülü içine enkapsüle edilen temozolomidin, 24. saat sonunda %66'sının salındığı tespit edilmiştir [156, 157]. Genisteinin polimerik nanopartiküllerden salım profilini inceleyen bir araştırmada, genisteinin %35-50'sinin PLGA-TPGS nanopartiküllerden salındığını ve 28 günün sonunda %42-64'ünün salımını gerçekleştirdiği belirlenmiştir [151].



Şekil 4. 15 TmzGenNP'nin temozolomid ve genistein için in vitro salım grafiği

#### 4.6 U87MG İnsan Glioblastoma Hücre Hattında Temozolomid ve Genistein Yüklü nanopartiküllerin In Vitro Aktiviteleri

Temozolomid, genistein ve bu iki etken madde yüklü PLGA nanopartiküllerin U87MG insan glioblastoma hücreleri üzerindeki in vitro etkinlikleri serbest moleküller ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Şekil 4.16'da U87MG insan glioblastoma hücrelerinin 10x ve 40x büyütmedeki ışık mikroskobu görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4. 16 U87MG insan glioblastoma hücrelerinin A)10X ve B)40X mikroskop görüntüleri

#### 4.6.1 Temozolomid ve Genistein Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi

Temozolomid ve genistein yüklü nanopartiküllerin U87MG hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi, serbest moleküller ile karşılaştırmalı olarak 24 ve 48 saat süre ile incelenmiştir. Bu amaçla TmzNP, GenNP, TmzGenNP ve bu nanopartiküllerden salınan madde miktarına eşit olacak şekilde temozolomid, genistein ve temozolomid-genistein kombinasyonu farklı doz aralıklarında U87MG hücreleri üzerine uygulanmış ve hücreler üzerindeki sitotoksik aktivite MTT yöntemi ile tespit edilmiştir.

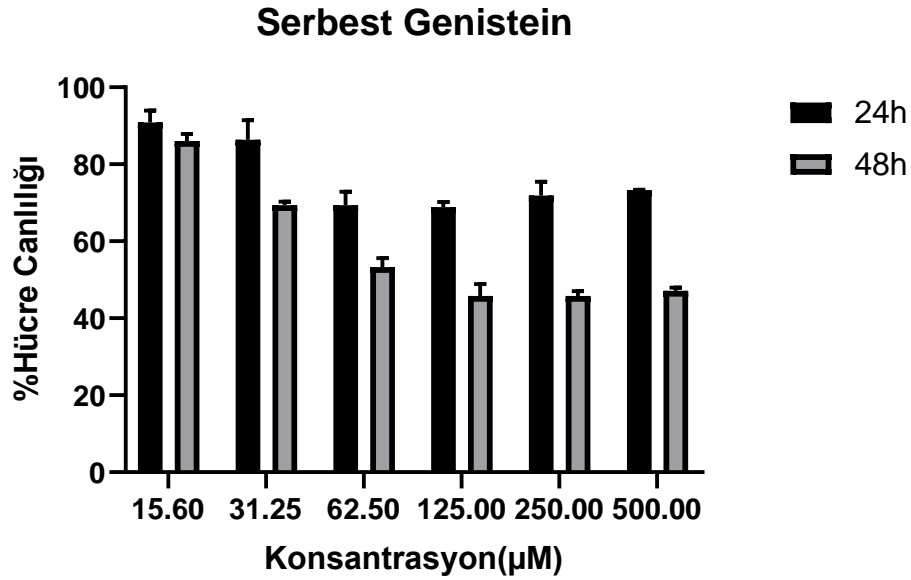
MTT yöntemi, tetrazolyum tuzlarının indirgenerek formazan kristallerine dönüşmesi sonucu hücre canlılığının renk değişimi ile kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanmasıdır. Canlı hücreler mor renkte boyanırken ölü hücrelerde tetrazolyum bileşiklerini indirgeyemeyeceğinden dolayı renk değişimi görülmez [158, 159].

Kullanılan hücre hattı olan U87MG 96 kuyulu mikropalakalara kuyu başına  $10^5$  hücre olacak şekilde ekildi ve  $37^{\circ}\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Serbest temozolomid konsantrasyonları sırayla mikropalakadaki kuyucuklara  $10\mu\text{M}$ ,  $20\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ,  $200\mu\text{M}$ ,  $500\mu\text{M}$  ekildi. Serbest genistein ise  $15,6\mu\text{M}$ ,  $31,25\mu\text{M}$ ,  $62,5\mu\text{M}$ ,  $125\mu\text{M}$ ,  $250\mu\text{M}$ ,  $500\mu\text{M}$  gibi farklı artan konsantrasyonlarda hücreler üzerine uygulandı. Temozolomid-genistein kombinasyonu, temozolomid NP, genistein NP, temozolomid-genistein NP  $10\mu\text{g/ml}$ ,  $20\mu\text{g/ml}$ ,  $40\mu\text{g/ml}$ ,  $50\mu\text{g/ml}$ ,  $75\mu\text{g/ml}$ ,  $100\mu\text{g/ml}$ ,  $150\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı.

Serbest temozolomide ait mikropalaklar 24, 48 ve 72 saat, serbest genisteine ait mikropalaklar, temozolomid-genistein kombinasyonuna ait, temozolomid nanopartikülüne ait, genistein nanopartikülüne ve temozolomid-genistein nanopartikülüne ait mikropalaklar 24 ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelerdeki sitopatolojik değişiklikler kontrol grubuyla kıyaslama yapılarak mikroskopta incelendi.



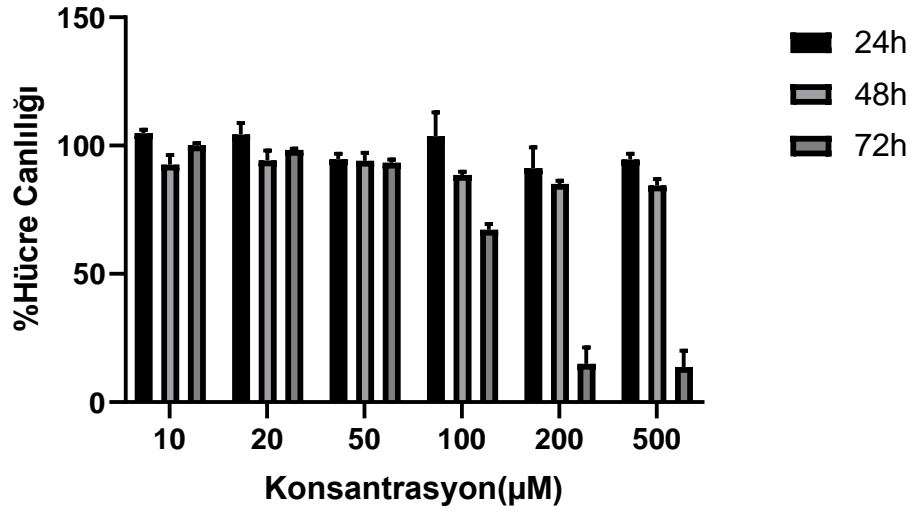
Serbest genisteinin 15,6  $\mu\text{M}$ , 31,25  $\mu\text{M}$ , 62,5  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  olacak şekilde değişen konsantrasyonlarda hücre canlılığına etkisi 24 ve 48 saat süre ile incelendi (Şekil 4.17). U87MG hücrelerinin 24 saat süre ile genisteinle inkübasyonu sonrası kontrol grubu ile kıyaslandığında 62.50  $\mu\text{M}$  üzeri konsantrasyonlarda %70 oranında hücre canlılığını azalttığı gözlemlendi. Buna karşın 48 saat süre ile genistein uygulanan U87MG insan glioblastoma hücrelerinde 24.36  $\mu\text{M}$  konsantrasyonundan itibaren hücrelerin canlılığının azalmaya başladığı, hücrelerin morfolojilerinin bozulduğu tespit edilmiştir. Serbest genisteinin 48. saat sonunda  $\text{IC}_{50}$  değeri ise 24.36  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4. 17** Genisteinin U87MG hücre canlılığına 24 ve 48 saat süre ile etkisi

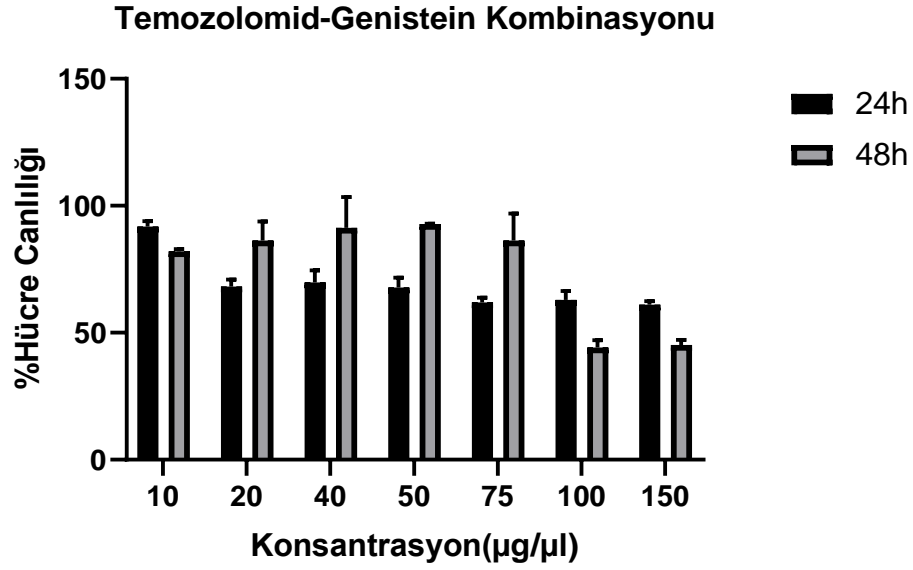
Temozolomidin 10 $\mu\text{M}$ , 20 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$ , 200 $\mu\text{M}$ , 500 $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında 24, 48 ve 72 saat süre ile U87MG hücre canlılığına olan etkisi Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak U87MG insan glioblastoma hücreleri üzerinde 24 ve 48 saatlerde temozolomidin yüksek dozlarda bile hücre canlılığını düşürmede anlamlı bir etkisi olmadığı, ancak 72 saat sonrasında ise temozolomid uygulanan U87MG insan glioblastoma hücrelerinin 88.96  $\mu\text{M}$  konsantrasyondan sonra sitotoksitesinin belirgin olarak arttırdığı bulundu. Serbest temozolomidin  $\text{IC}_{50}$  değeri 88.96  $\mu\text{M}$ , uygulanan 150  $\mu\text{g/ml}$ 'de %86 hücre canlılığı inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

### Serbest Temozolomid



Şekil 4. 18 Temozolomidin U87MG hücre canlılığına 24, 48 ve 72 saat süre ile etkisi

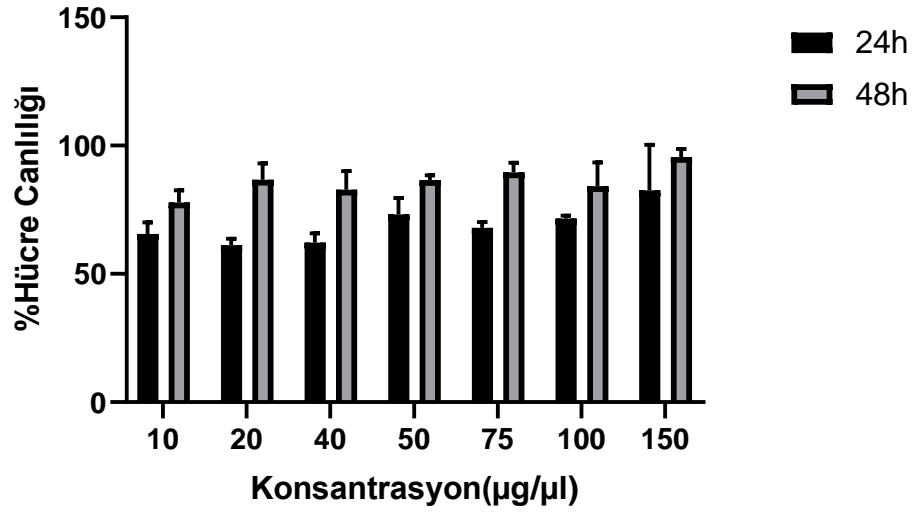
Temozolomid-genistein kombinasyonunun U87MG hücrelerine 10µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saat uygulanması sonrası 24. saatte IC<sub>50</sub> değeri 15.29µg/ml olarak tespit edilmiştir. Şekil 4.19’da verildiği gibi temozolomid-genistein kombinasyonu ile inkübe edilen U87MG hücrelerinin 48. saat sonunda IC<sub>50</sub> değeri ise 71.48 µg/ml olarak bulunmuştur. Serbest genistein ve serbest temozolomide göre iki etken maddenin kombinasyonunun U87MG hücrelerin canlılığını % 62 oranında 150 µg/ml’de daha yüksek düzeyde azalttığı gözlemlenmiştir.



**Şekil 4. 19** Temozolomid-genistein kombinasyonunun U87MG hücre canlılığına 24 ve 48 saat süre ile etkisi

TmzNP'nin 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml konsantrasyonlarında 24 ve 48 saat süre ile U87MG hücre canlılığına etkisi Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Kontrole kıyasla U87MG hücre hattında uygulanan TMZNP'lerin artan dozlarında dahi anlamlı farklılık gözlemlenmemiştir. Ancak TmzNP'nin 150 µg/ml konsantrasyonda %72 U87MG hücre canlılığını azaltarak serbest temozolomide kıyasla daha etkili olduğu bulunmuştur.

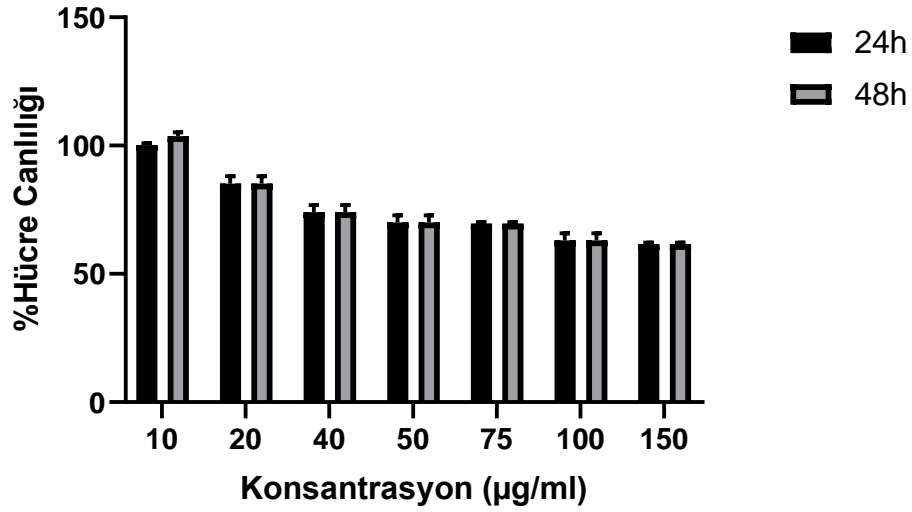
## Temozolomid Nanopartikül



Şekil 4. 20 Temozolomid nanopartikülünün (TmzNP) U87MG hücre canlılığına 24 ve 48 saat süre ile etkisi

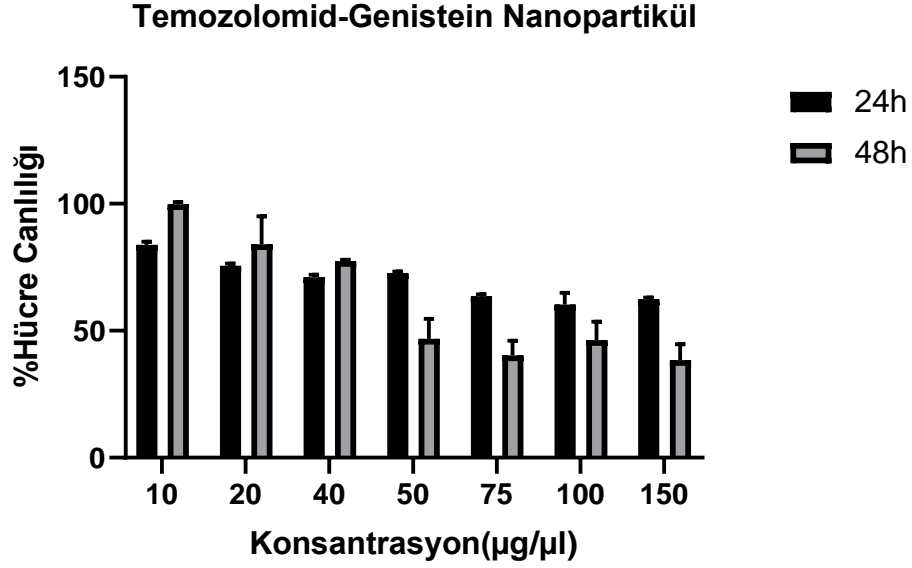
GenNP'nin U87MG hücre canlılığına etkisi 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml ve 150 µg/ml konsantrasyonlarında 24 ve 48 saat süre ile incelenmiştir. Şekil 4.21'de 10 µg/ml GenNP uygulanan U87MG hücrelerinde hücre canlılığı % 88, 150 µg/ml GenNP uygulanan hücrelerde hücre canlılığı ise % 62 olarak tespit edilmiştir. GenNP'nin artan konsantrasyonlarının hücre canlılığını azalttığı gözlemlense de kontrole kıyasla hücre ölümü üzerinde önemli bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

## Genistein Nanopartikül



**Şekil 4. 21** Genistein nanopartikülünün U87MG hücre canlılığına 24 ve 48 saat süre ile etkisi

Temozolomid-genistein nanopartikülü (Şekil 4.22) 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml doz aralıklarında 24 ve 48 saatlerinde hücre canlılıkları hesaplandı. Temozolomid-genistein nanopartiküllerinin 24. saatte sitotoksik etki gösterdiği ve IC<sub>50</sub> değeri 16.72 µg/ml olarak bulunmuştur. Nanopartiküller ile 48 saat inkübe edilen U87MG hücrelerinin IC<sub>50</sub> değeri 3.43 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Temozolomid-genistein nanopartikülü 10 µg/ml konsantrasyonda % 58, 150 µg/ml dozda ise % 25 hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Hücrelere uygulanan serbest temozolomid ile genistein, temozolomid-genistein kombinasyonu, temozolomid nanopartikülü ve genistein nanopartikülüne göre temozolomid-genistein nanopartikülünün hücre üzerinde yüksek canlılık değişimi sağladığı belirlenmiştir. Temozolomid-genistein nanopartiküllerinin düşük dozlarının bile U87MG hücrelerinin büyümesi önemli ölçüde inhibe etmiştir.



**Şekil 4. 22** Temozolomid-genistein nanopartikülünün U87MG hücre canlılığına 24 ve 48 saat süre ile etkisi

Literatürde daha önce rapor edilen çalışmalar ile elde edilen bulguların uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Serbest temozolomidin 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonrasında U87MG hücre hattında canlılığın değişmediği gözlemlenmiştir. Ancak, temozolomid uygulanan hücrelerde, süre arttıkça kontrole göre canlı hücreler üzerindeki proliferasyonu inhibe etme etkisinin olduğu gözlemlenmiştir [160]. Serbest genisteinin U87MG hücrelerine %70 oranında hücre canlılığına etkisi olduğu yapılan çalışmada gösterilmiştir [161].

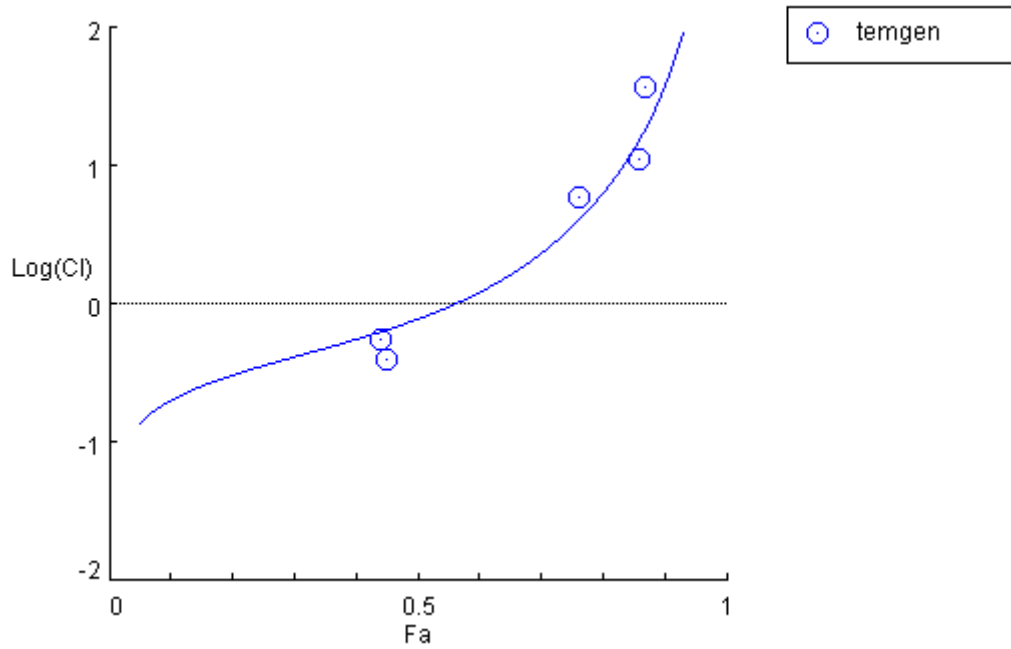
In vitro sitotoksisite çalışmaları sonucu TmzNP ve GenNP'nin U87MG hücreleri üzerinde anlamlı bir sitotoksik aktivite göstermediğini tespit edilmiştir. Buna karşın 48 saat süre ile TmzGenNP uygulaması U87MG hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır. Bu nedenle, ileri in vitro uygulamalarda TmzGenNP'nin anti-kanser aktivitesi incelenmiştir.

#### **4.6.2 Temozolomid-Genistein U87MG Hücreleri Üzerindeki Kombinasyon indeksinin hesaplanması**

Temozolomid ve genisteinin ilaç sinerjileri, CalcuSyn yazılımı (Biosoft Version 2.1, Cambridge, UK) kullanılarak medyan etki prensibinden türetilen kombinasyon indeks metodu ile değerlendirildi. Bu amaçla temozolomid, genistein ve

temozolomid-genistein kombinasyonlarının 24 ve 48 saat  $IC_{50}$  değerleri temel alınmıştır. CalcuSyn yazılımı ile kombinasyon indeksi (CI) ve doz azaltma indeksi (DRI) değerleri  $IC_{50}$  değerlerine gore tespit edilmiştir. CI değerleri  $<1$  ise sinerjizmi,  $CI=1$  ise ilave bir etki ve  $CI > 1$  ise antagonizmi gostermektedir [162].

Temozolomid-genistein etken molekullerinin U87MG huce hattında kombinasyon indeksi (CI) hesaplaması sonucu iki ilacın sinerjik etki gosterdiği tespit edilmiş ve CI değeri 0.78723 olarak belirlenmiştir. şekil 4.23'te temozolomid, genistein ve temozolomid-genistein kombinasyonlarının CI değerinin logaritmik eğrisi gosterilmiştir.



şekil 4. 23 Temozolomid ve genisteinin kombinasyon indeksi eğrisi

#### 4.6.3 Temozolomid-Genistein Kombinasyonu ve Temozolomid-Genistein NP'lerin U87MG Huceleri zerindeki Huce Gocu Etkisi

Temozolomid-genistein kombinasyonu ile TmzGenNP U87MG huceleri zerinde 0, 6, 12, 24 ve 48 saatler huce gocuine etkisi incelenmiştir. Tmz/Gen kombinasyonu ve TmzGenNP'nin U87MG hucelerinde oluşturulan yara mesafesini kontrole gore daha az kapattıkları tespit edilmiştir. Kontrol

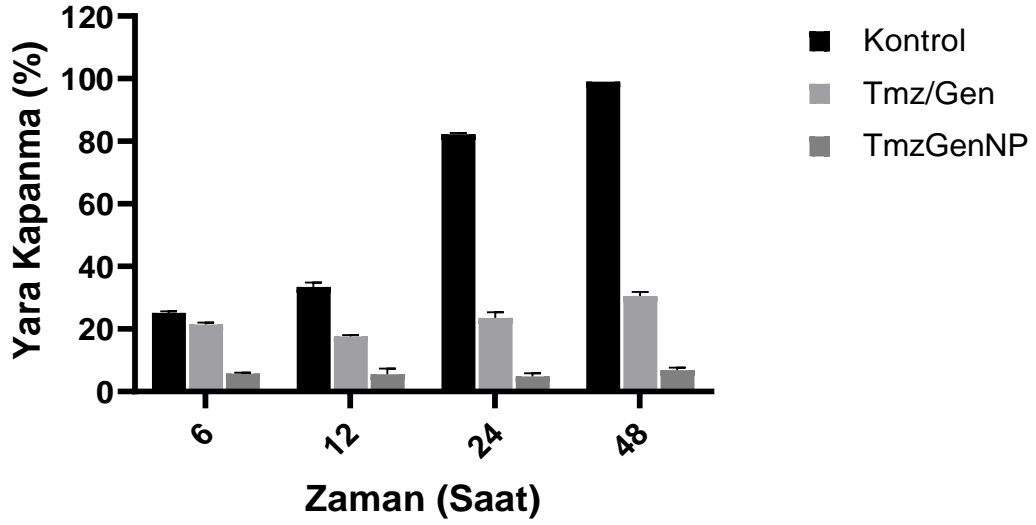
hücrelerinde yara mesafesinin 24. saatte %82'isi kapanırken, Tmz/Gen kombinasyonu uygulanan hücrelerde %24, TmzGenNP uygulanan hücrelerde ise %10 kapanma gözlemlenmiştir. Şekil 4.25'de Tmz/Gen kombinasyonunun ve TmzGenNP'nin U87MG hücreleri üzerindeki yara iyileşme görüntüleri ve Şekil 4.24'de yara kapanma yüzdesi grafiği verilmiştir.

Hücre içindeki göç etme yeteneği, hücrenin dokuları veya farklı organları arasındaki konumlara geçmesini sağlar. Hücre göçü, hem fizyolojik hem patolojik süreçlerin temel özelliklerinden biridir. Patolojide hücre göçü, karsinomların invazyonuyla farklı doku veya organlara yayılmasına neden olur [163]. 2D yara iyileşme testi, hücre tabakasının pipet yardımıyla tahrip edilmesidir. Yara iyileşme deneyi birkaç adımdan oluşur. Bunlar; hücre hasarı (yaralanma), iyileşme sürecinin izlenmesi, veri toplaması (mikroskop kullanılarak ölçüm) ve verilerin değerlendirilmesidir. Tümör hücreleri, sağlıklı hücrelere göre kıyasla (0,1 ile 0,3  $\mu\text{m}/\text{dk}$ ) en yavaş göç eden hücrelerdir [164, 165].

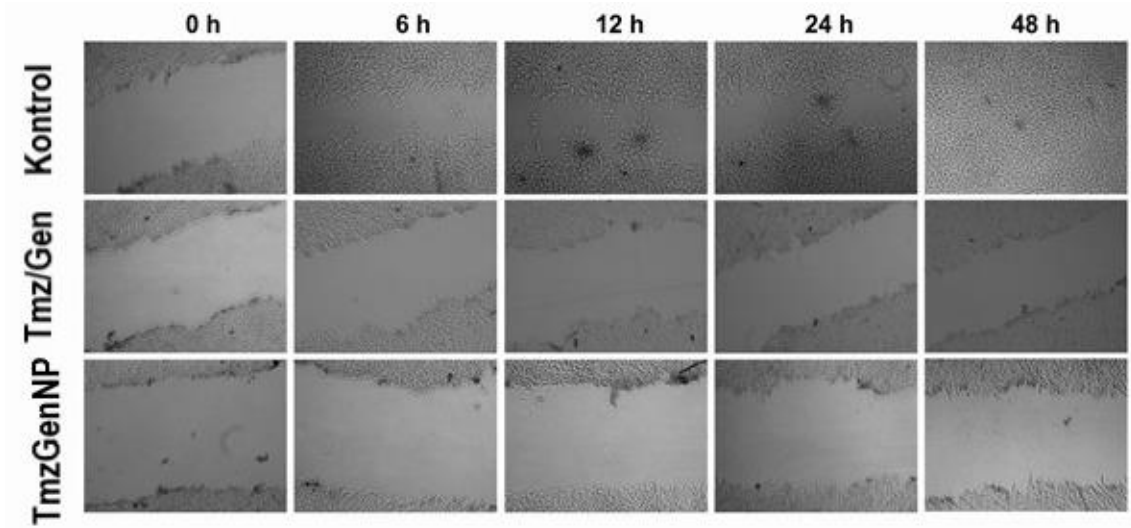
Literatürde, U87MG hücrelerine temozolomid ve timokuinon kombinasyonunun hücre göçü üzerine etkisinin kontrol hücrelerine kıyasla % 63 oranında düşürdüğü görülmüştür [166]. U87 hücrelerinin göç etme yeteneği değerlendirmesi için temozolomid ile resveratrolün serbest ve kombinasyonları uygulanmıştır. Serbest resveratrol U87 hücrelerinin göçünde % 25, temozolomid ile kombinasyonunda %30 oranında yara iyileşme etkisi göstermiştir [167]. Darshana Jain ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, serbest temozolomid ve temozolomid-PLA nanopartikülü uygulanan U87MG hücrelerine temozolomid % 16, temozolomid-PLA nanopartikülü % 19 kapanma ile yara iyileştirme aktivitesi göstermiştir [168].

Shafiee ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, genistein uygulanan HT29 kolon kanseri hücreleri yara iyileşme testinde göç eden hücrelerin sayısı önemli ölçüde 50 $\mu\text{M}$  dozunda azaltmıştır [169]. MDA-MB-231 ve MCF7 meme kanseri hücreleri üzerine yapılan çalışmada, genisteinin yara iyileşme testinde kontrol grubuna kıyasla %49 oranında yara kapanmasını önlenmiştir [170].





Şekil 4. 24 Tmz/Gen ve TmzGenNP'nin U87MG hücrelerinde yara kapanmasına etkisinin yüzdesel gösterimi



Şekil 4. 25 Tmz/Gen ve TmzGenNP'nin U87MG hücre göçüne etkisi

#### 4.6.4 Temozolomid-Genistein Ve Temozolomid-Genistein NP'lerin U87MG Hücreleri Üzerindeki Anti-Proliferatif Etkisi

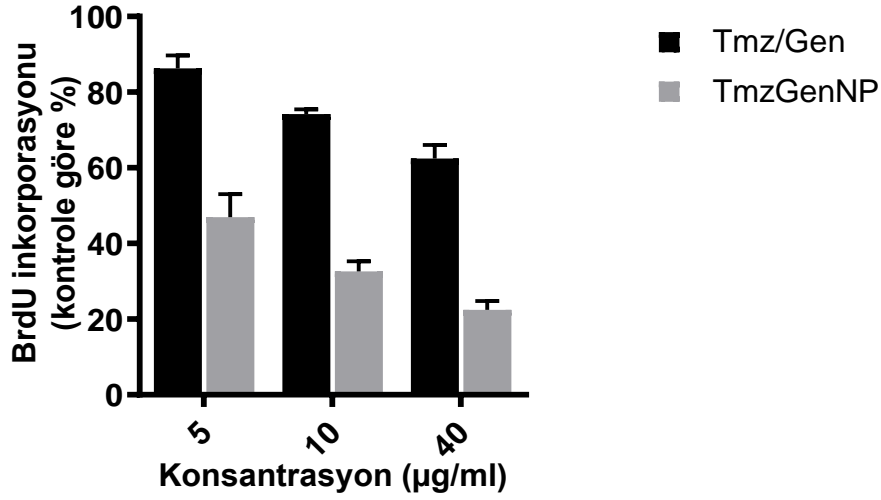
Tmz/Gen kombinasyonu ve TmzGenNP etken moleküllerinin U87MG hücrelerinin proliferasyonuna etkisi kolorimetrik olarak BrdU yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kontrolsüz hücre çoğalması, kanser ilerlemesinin önemli karakteristik özelliklerinden biridir. BrdU, DNA sentezi sırasında bölünen hücrelere bağlanan

bir timidin analogudur [171]. BrdU ile işaretlemeye, yüksek BrdU seviyeleri artan hücre proliferasyonuna işaret etmektedir [172].

U87MG hücreleri üzerinde 5, 10 ve 40 µg/ml konsantrasyonlarında 48 saat süre ile Tmz/gen kombinasyonu ve TmzGenNP uygulaması sonucu hücre proliferasyonundaki değişim BrdU inkorporasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Tmz/Gen kombinasyonu uygulanan hücrelerdeki proliferasyon yüzdeleri, 5 µg/ml uygulanan hücrede %86, 10 µg/ml uygulanan hücrede %74 ve 40 µg/ml uygulananda %62 olarak bulunmuştur. TmzGenNP uygulanan hücrelerde ise proliferasyon yüzdeleri, 5 µg/ml uygulanan hücrede %46, 10 µg/ml uygulanan hücrede %32 ve 40 µg/ml uygulananda %22 olarak hesaplanmıştır. Tmz/Gen kombinasyonu uygulamasının U87MG hücre proliferasyonunu önemli ölçüde değiştirmedeği gösterilmiştir. Öte yandan, TmzGenNP uygulamasının U87MG hücre proliferasyonunu azalttığı gözlemlenmiştir.

Literatürde, temozolomid ile shikonin serbest ve kombinasyonunun glioblastoma hücreleri (GBM02 ve U118MG) üzerindeki proliferasyonundaki azalma BrdU yöntemi ile incelenmiştir. Serbest shikonin uygulanan GBM02 hücrelerinde proliferasyondaki azalma %30, temozolomid ve shikonin kombinasyonu uygulanan GBM02 hücrelerinde ise %35 olarak bulunmuştur. Kontrol hücrelerine kıyasla U118MG hücrelerine uygulanan serbest shikonin %38, temozolomid ve shikonin uygulanan U118MG hücrelerinde %17 olarak proliferasyon oranını daha fazla azalttığı bulunmuştur. Bu sonuçlar, her iki ilacın kombinasyon tedavisinde birleştirildiğinde anti-proliferatif etkisinin daha yüksek olduğunu göstermektedir [173].

Temozolomid ve genistein yüklü PLGA nanopartikülleri ile ilaçların kontrollü salımı ve dağıtımı sonucu daha düşük uygulama dozlarında bile U87MG hücre proliferasyonunun önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir.



Şekil 4. 26 Tmz/Gen ve TmzGenNP'nin U87MG hücre proliferasyonuna etkisi

#### 4.6.5 Temozolomid-Genistein Ve Temozolomid-Genistein NP'lerin U87MG Hücreleri Üzerinde Apoptoz İndüksiyonun Gen Düzeyinde Gösterimi

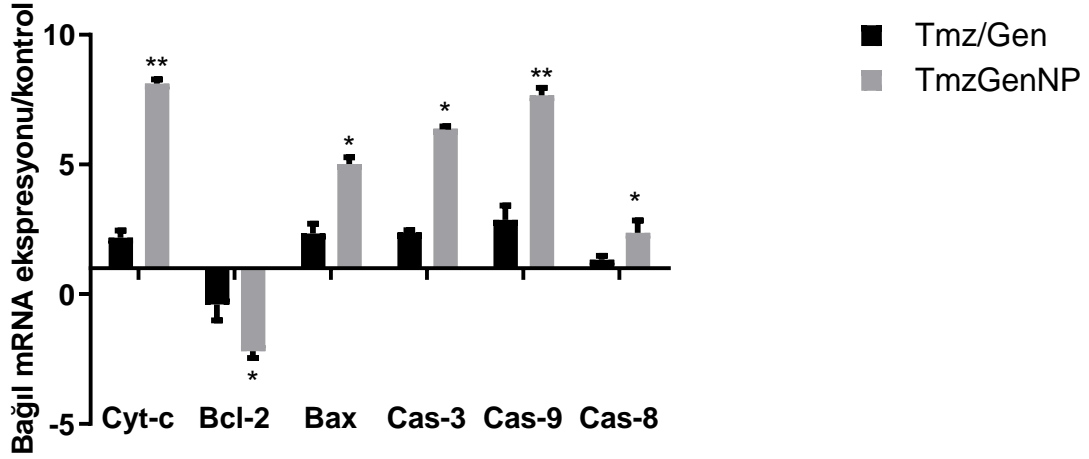
Tmz/Gen kombinasyonu ve TmzGenNP'lerin U87MG hücreleri üzerine 48 saatlik inkübasyonu sonrası  $\beta$ -aktin, kaspaz-3, kaspaz-9, sitokrom-c, Bcl-2, Bax, kaspaz-8 genlerinin ekspresyon düzeyleri kantitatif PCR analizi ile ölçülmüştür. Her bir mRNA'nın gen ekspresyon değişiklikleri, karşılaştırmalı  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemine göre hesaplanmıştır.

Apoptoz, hücrenin programlanmış hücre ölümü olup doğal mekanizmasıdır. Hem içsel hem de dışsal yollar, yüzlerce proteinin bölünmesi yoluyla apoptoz gerçekleştirmek için kaspazları kullanır. Kanserde, apoptotik yol tipik olarak, antiapoptotik proteinlerin aşırı ifadesi ve proapoptotik proteinlerin yetersiz ifadesi dahil olmak üzere çok çeşitli yollarla engellenir [174]. Elde edilen bulgular, flavonoidlerin kanser hücrelerinde apoptozu indüklemeye potansiyelinin, FAS inhibitör özellikleriyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu ve böylece polifenolik bileşiklerin kanser önleyici ve antineoplastik etkilerini uygulayabileceği yeni bir mekanizma sağladığını göstermektedir. Prostat ve meme kanseri üzerine yapılan çalışmada, flavonoidlerin hücre büyümesi inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu arasında dikkate değer etki gözlemlenmiştir [175]. İzoflavonoid olan genisteinin, HT-29 hücreleri ile 48 saat inkübasyonu sonucu apoptozu önemli derecede

indüklediği bulunmuştur [79]. Genistein, hücre döngüsü, apoptoz, anjiyogenez ve metastazın çeşitli aşamalarını modüle etmektedir. Genisteinin ana moleküler hedefleri arasında kaspazlar, Bcl-2, Bax, NF-κB, PI3K / Akt, MAPK ve Wnt / β-kateni sinyal yollarını etkilediği, kanserde apoptozu indüklediği bildirilmiştir [176].

Gossner ve arkadaşlarının, genistein uygulanan yumurtalık kanseri A2780 hücre hattı üzerinde hücre ölümü etkisini araştırmıştır. Genistein, çeşitli büyüme faktörü reseptörleri, PI3 kinaz ve PDK-1 gibi birçok Akt aktivatöründen birini hedefleyebildiğini veya doğrudan Akt'yi hedefleyebildiği böylece apoptozu indüklediği bulunmuştur [177]. Ayrıca, siklin bağımlı kinazların inhibitörü olan p21<sup>WAF1</sup>/CIP1 indüksiyonu ile ilişkili olan in vitro çeşitli kanser hücre hatlarında G2/M'de apoptoz ve hücre döngüsünü genisteinin indüklediği çalışmalarla desteklenmiştir [178].

Apoptoz indüksiyonunda içsel ve dışsal yolların hedeflenmesi, yeni anti-kanser ilaç geliştirmede önemli bir strateji olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, TmzGenNP aracılı apoptoz, apoptozda yer alan anahtar genlerin mRNA seviyelerinin kantitatif PCR ile tespit edilmesiyle belirlenmiştir. Şekil 4.27'de 48 saat TmzGenNP uygulamasından sonra Bax, Bcl-2, sitokrom-c, kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerini gösterilmiştir. Şekil 4.27'de gösterildiği gibi, TmzGenNP uygulaması sitokrom-c seviyesini kontrole göre 8.1 kat artmıştır. TmzGenNP ile muamele edilen U87MG hücrelerinde anti-apoptotik Bcl-2 geni aşağı regüle edilirken (kontrolün 2.18 katı), pro-apoptotik Bax geninde (kontrolün 5.01 katı) yukarı regülasyon gözlemlenmiştir. Ayrıca, TmzGenNP uygulaması, U87MG hücrelerinde kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyelerini sırasıyla 6.3 ve 7.6 kat yükseltmiştir. Öte yandan, kaspaz-8 mRNA ekspresyon seviyesinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir, bu da intrinsik apoptoz yolağının aktivasyonunu olduğu düşündürmektedir. TmzGenNP uygulamasından sonra U87MG hücrelerinde apoptotik genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrole göre arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 27 Sitokrom-c (Cyt-c), Bcl-2, Bax, kaspaz-3 (Cas-3), kaspaz-9 (Cas-9), kaspaz-8 (Cas-8) genlerinin kontrole göre relatif ekspresyonları

#### 4.6.6 Temozolomid-Genistein Ve Temozolomid-Genistein NP'lerin U87MG Hücreleri Üzerindeki Apoptoz İndüksiyonunun Protein Düzeyinde Gösterimi

U87MG hücreleri üzerinde Tmz/Gen kombinasyonun ve TmzGenNP'lerin apoptozu indüksiyonun protein düzeyinde gösterimi Western Blot analizi ile gerçekleştirilmiştir.

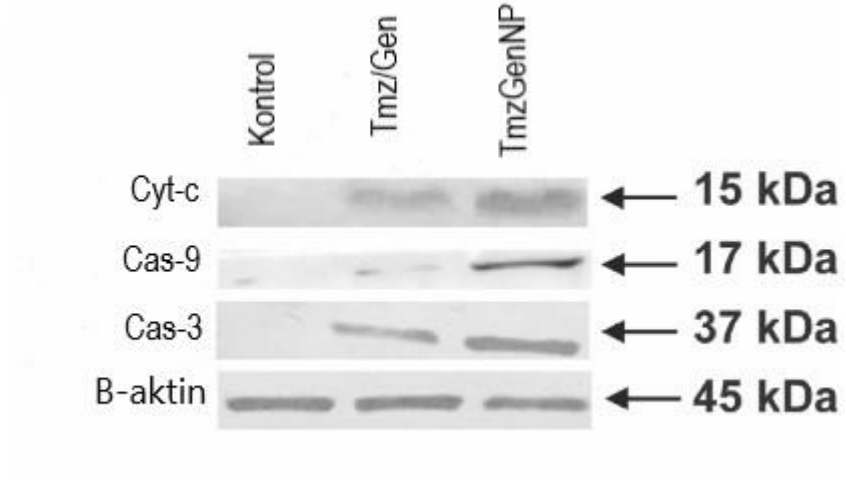
Proteaz ailesinin üyesi kaspazlar, apoptotik yolun merkezi uygulayıcıları olarak önemli bir rol oynayan evrimsel olarak korunmuş sistein proteazlarıdır. Kaspazlar, aktif enzimler üretmek için apoptoz sırasında proteolitik olarak bölünen inaktif proenzimler olarak sentezlenmektedir. Strese yanıt olarak hücreler, sitokrom c'yi mitokondrinin zarlar arası boşluğundan sitozole salgılar. Salınan sitokrom c, bağdaştırıcı protein Apaf-1'e bağlanır ve onu aktive eder, bu da ATP varlığında başlatıcı prokaspaz-9'u etkinleştirerek apoptozom oluşumuna ardından kaspaz-3 gibi yürütücü kaspazların aktivasyonunu sağlar [179].

Bu tez çalışmasında, Tmz/Gen kombinasyonu ve TmzGenNP etken moleküllerinin U87MG hücrelerine 48 saat uygulanmasıyla hücrel apoptozu olan etkisi incelenmiştir. Western Blot analizinde sitokrom-c, kaspaz-3 ve cleaved kaspaz-9 proteinlerinin ekspresyonuna bakılmıştır. Düzenleyici bir protein olan B-aktin, yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Şekil 4.28'de Tmz/Gen kombinasyonu ve TmzGenNP'nin kontrole kıyasla etkisi gösterilmiştir.

Sitokrom c, apoptozun erken aşamalarında mitokondriden salınır, ancak bu olayı düzenleyen kesin mekanizmalar belirsiz kalmıştır [180]. Tmz/Gen kombinasyonu ve TmzGenNP uygulanan U87MG hücreleri sitokrom-c proteininin yüksek düzeyde eksprese edildiği görülmüştür. Kaspaz ailesinin bir üyesi olan kaspaz-9, apoptoz ve sitokin sinyallemede yer alan kaspazlar, sistein-aspartik proteazlar ailesine aittir. Birçok dokuda bulunan apoptotik yol için kritik olan başlatıcı bir kaspazdır [181]. Tmz/Gen kombinasyonu ve TmzGenNP uygulanan örnekler bakıldığında, kontrole göre karşılaştırmalı olarak kombinasyonun ekspresyonunun az olduğu nanopartiküllerin ise ekspresyonun yüksek olduğu bulunmuştur.

U87MG hücrelerine Tmz/Gen kombinasyonu ve TmzGenNP'nin 48 saat uygulanması sonucu kaspaz-3 ekspresyonuna olan etkisi incelenmiştir. Örnekler kontrole kıyaslandığında Tem/Gen kombinasyonun kontrole neredeyse aynı düzeyde eksprese olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında Tem/Gen NP uygulanan hücrelerde ise daha yüksek düzeyde kaspaz-3 ekspresyonu tespit edilmiştir.

Ek olarak, Temozolomid gibi alkilleyici ajanların DNA'da çift sarmallı kırılmalara neden olduğu ve bunun da apoptozu tetiklediği bilinmektedir [182]. Das ve arkadaşları, temozolomidin insan glioblastoma T98G ve U87MG hücre hattında western blot analizinde sitokrom-c, kaspaz-9, kaspaz-3 ve Bcl-2 gibi genleri eksprese ettiğini, ancak sitokrom-c ve kaspaz-9 genlerinde asetazolamid ve deksametazon ile kombinasyonunda daha yoğun eksprese edildiği gösterilmiştir [183]. Yoon ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, genistein RPE-J hücreleri üzerinde muamelesi kaspaz-3 proteininin degradasyonunu indüklemiştir [184]. Genisteinle yapılan bir başka çalışmada MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri ER- $\alpha$  ve kaspaz-3 ekspresyonu incelenmiştir. ER- $\alpha$  proteini yanı sıra kaspaz-3 iki hücre hattı arasındaki farklı yoğunluklarda bant göstermiştir. Genistein, MDA-MB-231 hücrelerinde MCF-7 göre kaspaz-3 ekspresyonu yoğun olduğu gösterilmiştir [185].



**Şekil 4. 28** Tmz/Gen ve TmzGenNP uygulanan U87MG hücrelerinde siktokrom-c (Cyt-c), Kaspaz-9 (Cas-9), Kaspaz-3 (Cas-3) ve B-aktin proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin Western Blot ile gösterimi

Bu tez çalışmasında birçok kanser türünde farklı moleküler yollara etki eden genistein ve glioblastoma tedavisinde en sık kullanılan kemoterapötik ajan olan temozolomid yüklü polimerik nanopartiküllerin U87MG glioblastoma hücreleri üzerindeki anti-kanser etkinliği karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. İki etken maddenin PLGA nanopartikül sistemlere yüklenmesi, enkapsülasyon yolu ile etken moleküllerin yarılanma sürelerinin arttırılmasına, etki sürelerinin uzatılmasına ve suda çözünürlüğünün güçlendirerek biyoyararlanımın arttırılmasına olanak sağlayarak insan glioblastoma hücrelerinde anti-kanser aktivitesiyi arttırdığı tespit edilmiştir.

Bu tez çalışması ile genistein ve temozolomid yüklü PLGA nanopartikül sistemlerinin glioblastoma tedavisinde kullanılabilecek güçlü bir ilaç taşıma sistemi olabileceği literatürde ilk kez tespit edilmiştir.

Temozolomid ve genistein yüklü PLGA nanopartiküllerin elde edilmesi için tekli emülsiyon çözücü uçurma yöntemi (o/w) kullanılmıştır. Üretilen nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri, in vitro salım özellikleri tespit edilmiş ve partiküllerin reaksiyon verimi (RV), enkapsülasyon verimi (EE) ve etken yükleme verimi (DL) hesaplanmıştır. Ayrıca nanopartiküllerin yüzey özellikleri SEM ve FT-IR analizleri ile incelenmiştir.

Etken maddelerin tek ve ikili olarak PLGA nanopartiküllerine enkapsülasyonu sonucu elde edilen fiziko-kimyasal analiz sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir. Enkapsülasyon etkinlik değerleri, temozolomid nanopartiküllerinin %6.3 ile %25.3, genistein nanopartikülü için %42, temozolomid-genistein nanopartikülü için temozolomidin %38 genisteinin %30 olarak hesaplanmıştır.

Üretilen nanopartiküllerin boyutları ve PDI değerleri, temozolomid yüklü nanopartiküller için 145 nm ve 165 nm, PDI değerleri ise 0.229 ile 0.113 olarak belirlenmiştir. Genistein yüklü nanopartikülün ise boyutu 180 nm PDI değeri ise



0.164 olarak hesaplanmıştır. Temozolomid-genistein yüklü nanopartikülün boyutu 135.5 nm, PDI değeri 0.139 olarak belirlenmiştir. Nanopartiküller homojen ve dar boyut dağılımı göstermiştir. Hazırlanan TmzNP1, TmzNP2, GenNP, TmzGenNP nanopartiküllerinin zeta potansiyelleri sırasıyla -36.4 mV, -34.3 mV, -35.8 mV, -33.7 mV olarak tespit edilmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerden en yüksek sitotoksiteyi gösteren TmzGenNP hücre deneylerinde kullanılması için seçilmiştir. TmzGenNP'nin in vitro salım profili 30 günlük aralıklar ile takip edilmiştir. Bu süre sonunda temozolomid salımının %82.73, genisteinin salımının ise %100'ü tamamlanmıştır.

Bu tez çalışmasında üretilen nanopartiküllerin, U87MG hücre hattındaki sitotoksik etkisi serbest moleküller ile karşılaştırmalı olarak MTT yöntemiyle belirlenmiştir. Temozolomid-genistein kombinasyonunun 24 ve 48. saatlerdeki IC<sub>50</sub> değerleri 15.29 µg/ml ve 71.48 µg/ml olarak hesaplanmıştır. 24 ve 48 saat süre ile U87MG hücreleri üzerine TmzNP ve GenNP uygulaması U87MG hücre canlılığına etki etmemiştir. Ancak TmzGenNP sırasıyla 24 saat için 16.72 µg/ml ve 48 saat için 3.43 µg/ml IC<sub>50</sub> değerleri ile hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır. Elde edilen veriler, TmzGenNP'nin U87MG hücreleri üzerindeki sitotoksitesinin kontrole ve tek ilaç yüklü nanopartiküllere kıyasla daha yüksek olduğunu göstermektedir. Temozolomid ve genisteinin, serbest ve kombinasyonlarının ilaç sinerjileri Compusyn programı ile hesaplanmıştır. Temozolomid ve genisteinin kombinasyonlarının sinerjistik etki gösterdiği tespit edilmiş ve CI değeri 0.78723 olarak bulunmuştur.

TmzGenNP'nin U87MG hücrelerinin hücre göçü üzerine etkisi incelenmiştir. 0, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon sonucu TmzGenNP uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine göre mesafe daha kapanmıştır. Ayrıca, TmzGenNP uygulanan hücrelerde Tmz/Gen kombinasyonuna göre de yara mesafesinde daha az kapanma gözlenmiştir. Kontrol hücrelerinde yara mesafesinin 24. saatte %82'isi kapanırken, Tmz/Gen kombinasyonu uygulanan hücrelerin %24, TmzGenNP uygulanan hücrelerin ise %10'undaki yara mesafesi kapanmıştır.

Tmz/Gen kombinasyonu ve TmzGenNP'nin U87MG hücrelerinin proliferasyonuna olan etkisi BrdU inkorporasyon analizi ile belirlenmiştir. Proliferasyon yüzdesi, 5 µg/ml Tmz/Gen kombinasyonu uygulanan hücrede %86, 10 µg/ml uygulanan grupta %74, 40 µg/ml uygulanan grupta ise %62 olarak bulunmuştur. TmzGenNP uygulanan hücrelerde ise, 5 µg/ml'de %46, 10 µg/ml uygulanan hücrede %32 ve 40 µg/ml uygulananda ise %22 olarak hesaplanmıştır. TmzGenNP'nin hücre proliferasyonunu Tmz/Gen kombinasyonuna göre yüksek düzeyde inhibe ettiği bulunmuştur.

Tmz/Gen kombinasyonu ve TmzGenNP'nin U87MG hücrelerinde Bax, Bcl-2, sitokrom-c, kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi kantitatif PCR analizi ile gösterilmiştir. TmzGenNP'nin, sitokrom-c, kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyelerini yükselttiği belirlenmiş ve Bcl-2 ve Bax genleri arasındaki ters ilişkili ekspresyon gösterilmiştir. TmzGenNP uygulamasından sonra U87MG hücrelerinde artan sitokrom-c, kaspaz-3 ve kaspaz-9 mRNA ekspresyon seviyeleri, apoptozun intrinsik yolunun nanopartikül tedavisi ile aktive edildiğini göstermiştir.

TmzGenNP'nin U87MG hücrelerinde apoptozla ilişkili sitokrom-c, kaspaz-3, kaspaz-9 genlerinin ekspresyonuna etkisinin protein düzeyinde gösterimi Western Blot yöntemi gerçekleştirilmiştir. Tmz/Gen kombinasyonuna göre nanopartiküler formülasyon uygulanan hücrelerde mitokondri kontrollü apoptozda görevli sitokrom c aktivasyonu gerçekleşmiştir. Aynı zamanda apoptozun içsel yolağını aktive eden kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonu nanopartikül uygulanan hücrelerde gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında üretilen TmzGenNP polimerik nanopartiküller etken moleküllerin stabiletisini, biyoyararlanımını, suda çözünürlüklerini yükselterek insan glioblastoma hücreleri üzerinde sitotoksisite ve anti-tümör aktivite göstermiştir. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular, TmzGenNP'lerin U87MG insan glioblastoma hücrelerinde sitotoksisteyi arttırdığı, proliferasyonu azalttığı, migrasyonu azalttığı ve apoptozu indüklediğini göstermiştir.

Temozolomid ve genisteinin ikili enkapsülasyonunun U87MG glioblastoma hücreleri üzerinde gösterdiği anti-kanser aktivitenin olası moleküler etki mekanizmasını araştırmak için daha fazla çalışma gerekmesine rağmen, bu çalışmada elde edilen bulgular bu iki ajanın birlikte enkapsülasyonu ile elde edilen nanopartiküllerin, malign gliomun yayılmasına karşı koyma potansiyeline sahip olduğunu belirlemiştir. Bu bağlamda flavonoidlerin kanser ilaçlarıyla birlikte model olarak kullanılabilceği öngörülmektedir. Hücre kültüründe meydana gelen, tümör klonojeninin uzun vadeli üremesi, sağkalım sınırlaması nedeniyle *in vivo* hayvan testleri kullanılarak geliştirilebilir. Ayrıca insan glioblastoma tanı ve tedavisi için çok işlevli bir dağıtım sistemi olarak daha fazla çalışma gerekmektedir.

- [1] Nagai, H. and Y.H. Kim, *Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns*. Journal of thoracic disease, 2017. 9(3): p. 448.
- [2] Lee, S.Y., *Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme*. Genes & diseases, 2016. 3(3): p. 198-210.
- [3] Ekeblad, S., et al., *Temozolomide as monotherapy is effective in treatment of advanced malignant neuroendocrine tumors*. Clinical Cancer Research, 2007. 13(10): p. 2986-2991.
- [4] Ruiz-Cruz, S., et al., *Flavonoids: Important biocompounds in food*. Flavonoids: From Biosynthesis to Human Health; Justino, JG, Ed.; IntechOpen: London, UK, 2017: p. 353-369.
- [5] Gupta, V.K., et al., *Adjunct therapeutic potential of phytochemicals against cancer*, in *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*. 2020, Elsevier. p. 117-126.
- [6] Chen, F., et al., *Optimization of genistein solubilization by  $\kappa$ -carrageenan hydrogel using response surface methodology*. Food Science and Human Wellness, 2013. 2(3-4): p. 124-131.
- [7] Khan, I., K. Saeed, and I. Khan, *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities*. Arabian journal of chemistry, 2019. 12(7): p. 908-931.
- [8] Patra, J.K., et al., *Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects*. Journal of nanobiotechnology, 2018. 16(1): p. 1-33.
- [9] Hoshyar, N., et al., *The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction*. Nanomedicine, 2016. 11(6): p. 673-692.
- [10] Mahmoud, B.S., A.H. AlAmri, and C. McConville, *Polymeric nanoparticles for the treatment of malignant gliomas*. Cancers, 2020. 12(1): p. 175.
- [11] Ma, X. and H. Yu, *Cancer issue: global burden of cancer*. The Yale journal of biology and medicine, 2006. 79(3-4): p. 85.
- [12] Weis, J., *Cancer-related fatigue: prevalence, assessment and treatment strategies*. Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research, 2011. 11(4): p. 441-446.
- [13] Sadikovic, B., et al., *Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer*. Current genomics, 2008. 9(6): p. 394-408.
- [14] Chakraborty, S. and T. Rahman, *The difficulties in cancer treatment*. ecancermedalscience, 2012. 6.
- [15] Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
- [16] Kastan, M.B. and J. Bartek, *Cell-cycle checkpoints and cancer*. Nature, 2004. 432(7015): p. 316-323.

- [17] Blow, J.J. and A. Dutta, *Preventing re-replication of chromosomal DNA*. Nature reviews Molecular cell biology, 2005. 6(6): p. 476-486.
- [18] Nurse, P., *Ordering S phase and M phase in the cell cycle*. Cell, 1994. 79(4): p. 547-550.
- [19] Pardee, A.B., *G1 events and regulation of cell proliferation*. Science, 1989. 246(4930): p. 603-608.
- [20] Barnum, K.J. and M.J. O'Connell, *Cell cycle regulation by checkpoints*, in *Cell Cycle Control*. 2014, Springer. p. 29-40.
- [21] Ding, L., et al., *The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer*. International journal of molecular sciences, 2020. 21(6): p. 1960.
- [22] Wolgemuth, D.J., M. Manterola, and A. Vasileva, *Role of cyclins in controlling progression of mammalian spermatogenesis*. The International journal of developmental biology, 2013. 57: p. 159.
- [23] Garrido-Castro, A.C. and S. Goel, *CDK4/6 inhibition in breast cancer: mechanisms of response and treatment failure*. Current breast cancer reports, 2017. 9(1): p. 26-33.
- [24] Cerqueira, A., et al., *Genetic characterization of the role of the Cip/Kip family of proteins as cyclin-dependent kinase inhibitors and assembly factors*. Molecular and cellular biology, 2014. 34(8): p. 1452-1459.
- [25] Abbas, T. and A. Dutta, *p21 in cancer: intricate networks and multiple activities*. Nature Reviews Cancer, 2009. 9(6): p. 400-414.
- [26] Wierød, L., et al., *Activation of the p53-p21 Cip1 pathway is required for CDK2 activation and S-phase entry in primary rat hepatocytes*. Oncogene, 2008. 27(19): p. 2763-2771.
- [27] Eichler, A.F., et al., *The biology of brain metastases—translation to new therapies*. Nature reviews Clinical oncology, 2011. 8(6): p. 344.
- [28] Walker, C., et al., *Biology, genetics and imaging of glial cell tumours*. The British journal of radiology, 2011. 84(special\_issue\_2): p. S90-S106.
- [29] Jiang, Y. and L. Uhrbom, *On the origin of glioma*. Upsala journal of medical sciences, 2012. 117(2): p. 113-121.
- [30] Urbańska, K., et al., *Glioblastoma multiforme—an overview*. Contemporary oncology, 2014. 18(5): p. 307.
- [31] Mansouri, A., J. Karamchandani, and S. Das, *Molecular genetics of secondary glioblastoma*. Exon Publications, 2017: p. 27-42.
- [32] Hambardzumyan, D. and G. Bergers, *Glioblastoma: defining tumor niches*. Trends in cancer, 2015. 1(4): p. 252-265.
- [33] Xie, Q., S. Mittal, and M.E. Berens, *Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion*. Neuro-oncology, 2014. 16(12): p. 1575-1584.

- [34] Pearson, J.R. and T. Regad, *Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme*. Signal transduction and targeted therapy, 2017. 2(1): p. 1-11.
- [35] Li, X., et al., *PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma*. Oncotarget, 2016. 7(22): p. 33440.
- [36] Tamimi, A.F. and M. Juweid, *Epidemiology and outcome of glioblastoma*. Exon Publications, 2017: p. 143-153.
- [37] Iacob, G. and E.B. Dinca, *Current data and strategy in glioblastoma multiforme*. Journal of medicine and life, 2009. 2(4): p. 386.
- [38] Dréan, A., et al., *Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma*. Expert review of neurotherapeutics, 2016. 16(11): p. 1285-1300.
- [39] Bergers, G. and S. Song, *The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance*. Neuro-oncology, 2005. 7(4): p. 452-464.
- [40] Alvarez, J.I., T. Katayama, and A. Prat, *Glial influence on the blood brain barrier*. Glia, 2013. 61(12): p. 1939-1958.
- [41] Baskar, R., et al., *Cancer and radiation therapy: current advances and future directions*. International journal of medical sciences, 2012. 9(3): p. 193.
- [42] Fernandes, C., et al., *Current standards of care in glioblastoma therapy*. Exon Publications, 2017: p. 197-241.
- [43] Mohan, G., et al., *Recent advances in radiotherapy and its associated side effects in cancer—a review*. The Journal of Basic and Applied Zoology, 2019. 80(1): p. 1-10.
- [44] Srinivas, U.S., et al., *ROS and the DNA damage response in cancer*. Redox biology, 2019. 25: p. 101084.
- [45] Ahluwalia, M.S., *Chemotherapy for Brain Tumors*, in *Schmidk and Sweet Operative Neurosurgical Techniques*. 2012, Elsevier. p. 94-104.
- [46] Strobel, H., et al., *Temozolomide and other alkylating agents in glioblastoma therapy*. Biomedicines, 2019. 7(3): p. 69.
- [47] Ito, M., et al., *Early Chk1 phosphorylation is driven by temozolomide-induced, DNA double strand break-and mismatch repair-independent DNA damage*. PloS one, 2013. 8(5): p. e62351.
- [48] Shergalis, A., et al., *Current challenges and opportunities in treating glioblastoma*. Pharmacological reviews, 2018. 70(3): p. 412-445.
- [49] Belter, A., J. Barciszewski, and A.-M. Barciszewska, *Revealing the epigenetic effect of temozolomide on glioblastoma cell lines in therapeutic conditions*. PloS one, 2020. 15(2): p. e0229534.
- [50] Saini, V., et al., *Prospective observational study of adverse drug reactions of anticancer drugs used in cancer treatment in a tertiary care hospital*. Indian journal of pharmaceutical sciences, 2015. 77(6): p. 687.

- [51] Panche, A., A. Diwan, and S. Chandra, *Flavonoids: an overview*. Journal of nutritional science, 2016. 5.
- [52] Woźniak, D., E. Lamer-Zarawska, and A. Matkowski, *Antimutagenic and antiradical properties of flavones from the roots of Scutellaria baicalensis Georgi*. Food/Nahrung, 2004. 48(1): p. 9-12.
- [53] Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, and D.J. Bobilya, *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. The Journal of nutritional biochemistry, 2002. 13(10): p. 572-584.
- [54] Miadoková, E., *Isoflavonoids—an overview of their biological activities and potential health benefits*. Interdisciplinary toxicology, 2009. 2(4): p. 211-218.
- [55] Chahar, M.K., et al., *Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs*. Pharmacognosy reviews, 2011. 5(9): p. 1.
- [56] Abotaleb, M., et al., *Flavonoids in cancer and apoptosis*. Cancers, 2019. 11(1): p. 28.
- [57] Yang, Y., et al., *Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity: an evaluation using the blood–brain barrier cell and Caco-2 cell models*. Toxicology in Vitro, 2014. 28(3): p. 388-396.
- [58] Youdim, K.A., et al., *Flavonoid permeability across an in situ model of the blood–brain barrier*. Free Radical Biology and Medicine, 2004. 36(5): p. 592-604.
- [59] Agullo, G., et al., *Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition*. Biochemical pharmacology, 1997. 53(11): p. 1649-1657.
- [60] Miranda, C.L., C.S. Maier, and J.F. Stevens, *Flavonoids*. eLS, 2012.
- [61] Zhang, H.-W., et al., *Flavonoids inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy through downregulation of PI3K $\gamma$  mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K/ULK signaling pathway in human breast cancer cells*. Scientific reports, 2018. 8(1): p. 1-13.
- [62] Yoshimizu, N., et al., *Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation*. Alimentary pharmacology & therapeutics, 2004. 20: p. 95-101.
- [63] Romagnolo, D.F. and O.I. Selmin, *Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence*. Journal of nutrition in gerontology and geriatrics, 2012. 31(3): p. 206-238.
- [64] Batra, P. and A.K. Sharma, *Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives*. 3 Biotech, 2013. 3(6): p. 439-459.
- [65] Khan, N., V.M. Adhami, and H. Mukhtar, *Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer*. Biochemical pharmacology, 2008. 76(11): p. 1333-1339.

- [66] Khan, N., et al., *Fisetin, a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells*. *Carcinogenesis*, 2008. 29(5): p. 1049-1056.
- [67] Liskova, A., et al., *Flavonoids in cancer metastasis*. *Cancers*, 2020. 12(6): p. 1498.
- [68] Aggarwal, B.B. and S. Shishodia, *Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer*. *Biochemical pharmacology*, 2006. 71(10): p. 1397-1421.
- [69] Horn-Ross, P.L., et al., *Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States)*. *Cancer Causes & Control*, 2000. 11(4): p. 289-298.
- [70] Birt, D.F., S. Hendrich, and W. Wang, *Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids*. *Pharmacology & therapeutics*, 2001. 90(2-3): p. 157-177.
- [71] Skalicky, M., et al., *Isoflavones production and possible mechanism of their exudation in *Genista tinctoria* L. suspension culture after treatment with vanadium compounds*. *Molecules*, 2018. 23(7): p. 1619.
- [72] Information, N.C.f.B. *PubChem Compound Summary for CID 5280961, Genistein*. 4 May 2021; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Genistein>.
- [73] Mukund, V., et al., *Genistein: Its role in metabolic diseases and cancer*. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2017. 119: p. 13-22.
- [74] Swami, S., et al., *Inhibition of prostaglandin synthesis and actions by genistein in human prostate cancer cells and by soy isoflavones in prostate cancer patients*. *International journal of cancer*, 2009. 124(9): p. 2050-2059.
- [75] Pavese, J.M., R.L. Farmer, and R.C. Bergan, *Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2010. 29(3): p. 465-482.
- [76] Gupta, S.C., et al., *Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2010. 29(3): p. 405-434.
- [77] Spagnuolo, C., et al., *Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions*. *Advances in nutrition*, 2015. 6(4): p. 408-419.
- [78] Davis, J.N., et al., *Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF- $\kappa$ B activation by TNF- $\alpha$  in blood lymphocytes*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001. 30(11): p. 1293-1302.
- [79] Zhou, P., et al., *Genistein induces apoptosis of colon cancer cells by reversal of epithelial-to-mesenchymal via a Notch1/NF- $\kappa$ B/slug/E-cadherin pathway*. *BMC cancer*, 2017. 17(1): p. 1-10.



- [80] Qin, J., et al., *Genistein induces activation of the mitochondrial apoptosis pathway by inhibiting phosphorylation of Akt in colorectal cancer cells*. *Pharmaceutical biology*, 2016. 54(1): p. 74-79.
- [81] Choudhury, S.R., et al., *Synergistic efficacy of sorafenib and genistein in growth inhibition by down regulating angiogenic and survival factors and increasing apoptosis through upregulation of p53 and p21 in malignant neuroblastoma cells having N-Myc amplification or non-amplification*. *Investigational new drugs*, 2010. 28(6): p. 812-824.
- [82] Zhang, Z., et al., *Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via ATM/p53-dependent pathway in human colon cancer cells*. *International journal of oncology*, 2013. 43(1): p. 289-296.
- [83] Banerjee, S., et al., *Multi-targeted therapy of cancer by genistein*. *Cancer letters*, 2008. 269(2): p. 226-242.
- [84] Sakla, M.S., et al., *Genistein affects HER2 protein concentration, activation, and promoter regulation in BT-474 human breast cancer cells*. *Endocrine*, 2007. 32(1): p. 69-78.
- [85] Xiao, Y., et al., *Synthesis, Characterization, and Evaluation of Genistein-Loaded Zein/Carboxymethyl Chitosan Nanoparticles with Improved Water Dispersibility, Enhanced Antioxidant Activity, and Controlled Release Property*. *Foods*, 2020. 9(11): p. 1604.
- [86] Chenthamara, D., et al., *Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration*. *Biomaterials research*, 2019. 23(1): p. 1-29.
- [87] Liang, X.-J., et al., *Circumventing tumor resistance to chemotherapy by nanotechnology*, in *Multi-Drug Resistance in Cancer*. 2010, Springer. p. 467-488.
- [88] Senapati, S., et al., *Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance*. *Signal transduction and targeted therapy*, 2018. 3(1): p. 1-19.
- [89] Vasir, J.K. and V. Labhasetwar, *Targeted drug delivery in cancer therapy*. *Technology in cancer research & treatment*, 2005. 4(4): p. 363-374.
- [90] Kim, C.-K. and S.-J. Lim, *Recent progress in drug delivery systems for anticancer agents*. *Archives of pharmacal research*, 2002. 25(3): p. 229-239.
- [91] Yun, Y.H., B.K. Lee, and K. Park, *Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation*. *Journal of Controlled Release*, 2015. 219: p. 2-7.
- [92] Homayun, B., X. Lin, and H.-J. Choi, *Challenges and recent progress in oral drug delivery systems for biopharmaceuticals*. *Pharmaceutics*, 2019. 11(3): p. 129.
- [93] Attia, M.F., et al., *An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2019. 71(8): p. 1185-1198.

- [94] Ghosh Dastidar, D., D. Ghosh, and G. Chakrabarti, *Tumour vasculature targeted anti-cancer therapy*. Vessel Plus, 2020. 4.
- [95] Bazak, R., et al., *Passive targeting of nanoparticles to cancer: A comprehensive review of the literature*. Molecular and clinical oncology, 2014. 2(6): p. 904-908.
- [96] Paduch, R., *The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis*. Cellular Oncology, 2016. 39(5): p. 397-410.
- [97] Muro, S., *Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems*. Journal of Controlled Release, 2012. 164(2): p. 125-137.
- [98] Bazak, R., et al., *Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature*. Journal of cancer research and clinical oncology, 2015. 141(5): p. 769-784.
- [99] Manzari, M.T., et al., *Targeted drug delivery strategies for precision medicines*. Nature Reviews Materials, 2021: p. 1-20.
- [100] Yetisgin, A.A., et al., *Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications*. Molecules, 2020. 25(9): p. 2193.
- [101] Matoba, T., et al., *Nanoparticle-mediated drug delivery system for atherosclerotic cardiovascular disease*. Journal of cardiology, 2017. 70(3): p. 206-211.
- [102] Akbarzadeh, A., et al., *Liposome: classification, preparation, and applications*. Nanoscale research letters, 2013. 8(1): p. 1-9.
- [103] Bozzuto, G. and A. Molinari, *Liposomes as nanomedical devices*. International journal of nanomedicine, 2015. 10: p. 975.
- [104] Hanafy, N.A., M. El-Kemary, and S. Leporatti, *Micelles structure development as a strategy to improve smart cancer therapy*. Cancers, 2018. 10(7): p. 238.
- [105] Kulthe, S.S., et al., *Polymeric micelles: authoritative aspects for drug delivery*. Designed Monomers and Polymers, 2012. 15(5): p. 465-521.
- [106] Bharali, D.J., et al., *Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers*. International journal of nanomedicine, 2009. 4: p. 1.
- [107] Madaan, K., et al., *Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues*. Journal of pharmacy & bioallied sciences, 2014. 6(3): p. 139.
- [108] Bugno, J., H.-j. Hsu, and S. Hong, *Tweaking dendrimers and dendritic nanoparticles for controlled nano-bio interactions: potential nanocarriers for improved cancer targeting*. Journal of drug targeting, 2015. 23(7-8): p. 642-650.
- [109] Joshi, K., et al., *Nanocrystalization: an emerging technology to enhance the bioavailability of poorly soluble drugs*. Pharmaceutical nanotechnology, 2019. 7(4): p. 259-278.

- [110] Junyaprasert, V.B. and B. Morakul, *Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs*. Asian journal of pharmaceutical sciences, 2015. 10(1): p. 13-23.
- [111] Banfield, J.F. and H. Zhang, *Nanoparticles in the environment*. Reviews in mineralogy and geochemistry, 2001. 44(1): p. 1-58.
- [112] Zhang, L., et al., *Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments*. Clinical pharmacology & therapeutics, 2008. 83(5): p. 761-769.
- [113] Pandey, P.K., A.K. Sharma, and U. Gupta, *Blood brain barrier: An overview on strategies in drug delivery, realistic in vitro modeling and in vivo live tracking*. Tissue barriers, 2016. 4(1): p. e1129476.
- [114] Daneman, R. and A. Prat, *The blood–brain barrier*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2015. 7(1): p. a020412.
- [115] Guterres, S.S., M.P. Alves, and A.R. Pohlmann, *Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications*. Drug target insights, 2007. 2: p. 117739280700200002.
- [116] Pathak, C., F.U. Vaidya, and S.M. Pandey, *Mechanism for development of nanobased drug delivery system*. Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems, 2019: p. 35-67.
- [117] Saeed, B.A., et al., *Antiangiogenic properties of nanoparticles: A systematic review*. International journal of nanomedicine, 2019. 14: p. 5135.
- [118] Wierzbicki, M., et al., *Comparison of anti-angiogenic properties of pristine carbon nanoparticles*. Nanoscale research letters, 2013. 8(1): p. 1-8.
- [119] Elmowafy, E.M., M. Tiboni, and M.E. Soliman, *Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly (lactic acid)/poly (lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles*. Journal of Pharmaceutical Investigation, 2019. 49(4): p. 347-380.
- [120] Song, R., et al., *Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications*. Drug design, development and therapy, 2018. 12: p. 3117.
- [121] Kim, K.-T., et al., *Recent progress in the development of poly (lactic-co-glycolic acid)-based nanostructures for cancer imaging and therapy*. Pharmaceutics, 2019. 11(6): p. 280.
- [122] Siddiqui, I.A. and H. Mukhtar, *Nanochemoprevention by bioactive food components: a perspective*. Pharmaceutical research, 2010. 27(6): p. 1054-1060.
- [123] Najar, I. and S. Das, *Poly-glutamic acid (PGA)-Structure, synthesis, genomic organization and its application: A Review*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2015. 6(6): p. 2258.
- [124] Tabatabaei Mirakabad, F.S., et al., *PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2014. 15(2): p. 517-535.

- [125] Su, S. and P.M. Kang, *Systemic review of biodegradable nanomaterials in nanomedicine*. *Nanomaterials*, 2020. 10(4): p. 656.
- [126] Makadia, H.K. and S.J. Siegel, *Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier*. *Polymers*, 2011. 3(3): p. 1377-1397.
- [127] Sequeira, J.A., et al., *Poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) matrix implants*, in *Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs*. 2018, Elsevier. p. 375-402.
- [128] Zhao, M., et al., *Nanocarrier-based drug combination therapy for glioblastoma*. *Theranostics*, 2020. 10(3): p. 1355.
- [129] Játiva, P. and V. Ceña, *Use of nanoparticles for glioblastoma treatment: a new approach*. *Nanomedicine*, 2017. 12(20): p. 2533-2554.
- [130] Fang, C., et al., *Temozolomide nanoparticles for targeted glioblastoma therapy*. *ACS applied materials & interfaces*, 2015. 7(12): p. 6674-6682.
- [131] U87MG. *U-87 MG (ATCC® HTB-14™)*. 12.18.2017; Available from: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-14.aspx?geo\\_country=tr#documentation](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-14.aspx?geo_country=tr#documentation).
- [132] Bijnsdorp, I.V., E. Giovannetti, and G.J. Peters, *Analysis of drug interactions*, in *Cancer cell culture*. 2011, Springer. p. 421-434.
- [133] Pauli, U., et al., *Extraction and amplification of DNA from 55 foodstuffs*. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 2000. 91(5): p. 491-501.
- [134] Blasi, P., *Poly (lactic acid)/poly (lactic-co-glycolic acid)-based microparticles: An overview*. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2019. 49(4): p. 337-346.
- [135] Derman, S., *Caffeic acid phenethyl ester loaded PLGA nanoparticles: effect of various process parameters on reaction yield, encapsulation efficiency, and particle size*. *Journal of Nanomaterials*, 2015. 2015.
- [136] Wan, W. and J.T. Yeow, *The effects of gold nanoparticles with different sizes on polymerase chain reaction efficiency*. *Nanotechnology*, 2009. 20(32): p. 325702.
- [137] Ananta, J.S., R. Paulmurugan, and T.F. Massoud, *Temozolomide-loaded PLGA nanoparticles to treat glioblastoma cells: a biophysical and cell culture evaluation*. *Neurological research*, 2016. 38(1): p. 51-59.
- [138] Sayiner, O., et al., *Development and in vitro evaluation of temozolomide-loaded PLGA nanoparticles in a thermoreversible hydrogel system for local administration in glioblastoma multiforme*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2020. 57: p. 101627.
- [139] Pool, H., et al., *Development of genistein-PEGylated silica hybrid nanomaterials with enhanced antioxidant and antiproliferative properties on HT29 human colon cancer cells*. *American journal of translational research*, 2018. 10(8): p. 2306.

- [140] Pinho, E., et al., *Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds*. Carbohydrate polymers, 2014. 101: p. 121-135.
- [141] Hu, Y., et al., *In vitro performance of lipid-PLGA hybrid nanoparticles as an antigen delivery system: lipid composition matters*. Nanoscale research letters, 2014. 9(1): p. 1-10.
- [142] Barichello, J.M., et al., *Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method*. Drug development and industrial pharmacy, 1999. 25(4): p. 471-476.
- [143] Tang, J., et al., *Eudragit nanoparticles containing genistein: formulation, development, and bioavailability assessment*. International journal of nanomedicine, 2011. 6: p. 2429.
- [144] Ling, Y., et al., *Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma*. International journal of pharmaceutics, 2012. 430(1-2): p. 266-275.
- [145] Lee, C.Y. and I.H. Ooi, *Preparation of temozolomide-loaded nanoparticles for glioblastoma multiforme targeting—Ideal versus reality*. Pharmaceuticals, 2016. 9(3): p. 54.
- [146] Jain, D.S., et al., *Unraveling the cytotoxic potential of Temozolomide loaded into PLGA nanoparticles*. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014. 22(1): p. 1-9.
- [147] Tiwari, G., et al., *Drug delivery systems: An updated review*. International journal of pharmaceutical investigation, 2012. 2(1): p. 2.
- [148] Honary, S. and F. Zahir, *Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1)*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2013. 12(2): p. 255-264.
- [149] Sengel-Turk, C., et al., *Surface modification and evaluation of PLGA nanoparticles: the effects on cellular uptake and cell proliferation on the HT-29 cell line*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2014. 24(2): p. 166-172.
- [150] Kocbek, P., et al., *Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody*. Journal of controlled release, 2007. 120(1-2): p. 18-26.
- [151] Wu, B., et al., *Genistein-loaded nanoparticles of star-shaped diblock copolymer mannitol-core PLGA-TPGS for the treatment of liver cancer*. Materials Science and Engineering: C, 2016. 59: p. 792-800.
- [152] Cannavà, C., et al., *Physico-chemical characterization of an amphiphilic cyclodextrin/genistein complex*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2010. 51(5): p. 1064-1068.
- [153] Łaszcz, M., et al., *Identification and physicochemical characteristics of temozolomide process-related impurities*. Molecules, 2013. 18(12): p. 15344-15356.

- [154] Hasan, A.S., et al., *Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release*. International journal of pharmaceutics, 2007. 344(1-2): p. 53-61.
- [155] Huang, X. and C.S. Brazel, *On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems*. Journal of controlled release, 2001. 73(2-3): p. 121-136.
- [156] Tian, X.-H., et al., *Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles*. International Journal of Nanomedicine, 2011. 6: p. 445.
- [157] Huang, G., et al., *Solid lipid nanoparticles of temozolomide: potential reduction of cardiac and nephric toxicity*. International journal of pharmaceutics, 2008. 355(1-2): p. 314-320.
- [158] Kim, D.-H., et al., *Cytotoxicity of ferrite particles by MTT and agar diffusion methods for hyperthermic application*. Journal of magnetism and magnetic materials, 2005. 293(1): p. 287-292.
- [159] Meletiadis, J., et al., *Comparison of NCCLS and 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) methods of in vitro susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method*. Journal of Clinical Microbiology, 2000. 38(8): p. 2949-2954.
- [160] Markiewicz-Żukowska, R., et al., *Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line*. BMC complementary and alternative medicine, 2013. 13(1): p. 1-9.
- [161] Baati, T., et al., *Biocompatible titanate nanotubes with high loading capacity of genistein: cytotoxicity study and anti-migratory effect on U87-MG cancer cell lines*. RSC advances, 2016. 6(103): p. 101688-101696.
- [162] Chou, T.-C., *Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method*. Cancer research, 2010. 70(2): p. 440-446.
- [163] Kramer, N., et al., *In vitro cell migration and invasion assays*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2013. 752(1): p. 10-24.
- [164] Stamm, A., et al., *In vitro wound healing assays—state of the art*. BioNanoMaterials, 2016. 17(1-2): p. 79-87.
- [165] Entschladen, F., et al., *Analysis methods of human cell migration*. Experimental cell research, 2005. 307(2): p. 418-426.
- [166] Pazhouhi, M., et al., *Synergistic effect of temozolomide and thymoquinone on human glioblastoma multiforme cell line (U87MG)*. Journal of cancer research and therapeutics, 2018. 14(5): p. 1023.
- [167] Xu, H., et al., *Synergistic anti-glioma effect of a coloaded nano-drug delivery system*. International journal of nanomedicine, 2017. 12: p. 29.
- [168] Jain, D., et al., *Surface-coated PLA nanoparticles loaded with temozolomide for improved brain deposition and potential treatment of gliomas: development, characterization and in vivo studies*. Drug delivery, 2016. 23(3): p. 989-1006.

- [169] Shafiee, G., et al., *Genistein induces apoptosis and inhibits proliferation of HT29 colon cancer cells*. International journal of molecular and cellular medicine, 2016. 5(3): p. 178.
- [170] Zhu, Y., et al., *Synergistic effect of bioactive anticarcinogens from soybean on anti-proliferative activity in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells in vitro*. Molecules, 2018. 23(7): p. 1557.
- [171] Wojtowicz, J.M. and N. Kee, *BrdU assay for neurogenesis in rodents*. Nature protocols, 2006. 1(3): p. 1399.
- [172] Kutwin, M., et al., *Assessment of the proliferation status of glioblastoma cell and tumour tissue after nanoplatinum treatment*. PLoS One, 2017. 12(5): p. e0178277.
- [173] Matias, D., et al., *Dual treatment with shikonin and temozolomide reduces glioblastoma tumor growth, migration and glial-to-mesenchymal transition*. Cellular Oncology, 2017. 40(3): p. 247-261.
- [174] Pfeffer, C.M. and A.T. Singh, *Apoptosis: a target for anticancer therapy*. International journal of molecular sciences, 2018. 19(2): p. 448.
- [175] Brusselmans, K., et al., *Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity*. Journal of Biological Chemistry, 2005. 280(7): p. 5636-5645.
- [176] Tuli, H.S., et al., *Molecular mechanisms of action of genistein in cancer: Recent advances*. Frontiers in pharmacology, 2019. 10: p. 1336.
- [177] Gossner, G., et al., *Genistein-induced apoptosis and autophagocytosis in ovarian cancer cells*. Gynecologic oncology, 2007. 105(1): p. 23-30.
- [178] Lin, H.-M., et al., *Galectin-3 mediates genistein-induced G2/M arrest and inhibits apoptosis*. Carcinogenesis, 2000. 21(11): p. 1941-1945.
- [179] Chandra, D. and D.G. Tang, *Detection of apoptosis in cell-free systems*, in *Apoptosis*. 2009, Springer. p. 65-75.
- [180] Ott, M., et al., *Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. 99(3): p. 1259-1263.
- [181] Kuida, K., *Caspase-9*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2000. 32(2): p. 121-124.
- [182] He, Y. and B. Kaina, *Are there thresholds in glioblastoma cell death responses triggered by temozolomide?* International journal of molecular sciences, 2019. 20(7): p. 1562.
- [183] Das, A., N.L. Banik, and S.K. Ray, *Modulatory effects of acetazolamide and dexamethasone on temozolomide mediated apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells*. Cancer investigation, 2008. 26(4): p. 352-358.

- [184] Yoon, H.S., et al., *Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP*. Biochemical and biophysical research communications, 2000. 276(1): p. 151-156.
- [185] Yang, S., Q. Zhou, and X. Yang, *Caspase-3 status is a determinant of the differential responses to genistein between MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2007. 1773(6): p. 903-911.



## TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

---

### **Konferans Bildirileri**

1. Meteoğlu İ., Erdemir A., " Temozolomid ve Genistein Yüklü Nanopartiküllerin Glioblastoma Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesinin Belirlenmesi", 9.Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 19-20 Aralık 2020, s.34

2. Meteoğlu İ., Erdemir A., " Evaluation of genistein and temozolomide loaded polymeric nanoparticles on U87MG glioblastoma cell migration", 23<sup>rd</sup> JCF Frühjahrssymposium, LEIPZIG, ALMANYA, 29 Mart- 1Nisan 2021, s.85

### **Projeler**

1. Meteoğlu İ., Erdemir A., "Temozolomid ve farklı flavonoid kombinasyonlarının glioblastoma hücre hatında antiproliferatif ve apoptotik aktivitesinin belirlenmesi", YTÜ BAP Y.Lisans, FYL-2019-3780.