



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİ İLE KANSER
TEDAVİSİNE YÖNELİK *INULA HELENİUM*
EKSTRAKTI VE AMİGDALİN YÜKLÜ
NANOFİBERLERİN ÜRETİMİ**

RABİA BETÜL SULUTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Programı

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye CESUR

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ

İSTANBUL, 2024



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİ İLE KANSER
TEDAVİSİNE YÖNELİK *INULA HELENİUM*
EKSTRAKTI VE AMİGDALİN YÜKLÜ
NANOFİBERLERİN ÜRETİMİ**

RABİA BETÜL SULUTAŞ

533322006

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Programı

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye CESUR

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ

İSTANBUL, 2024

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, Marmara Üniversitesi BAPKO Proje No: FYL-2024-11178 tarafından desteklenmiştir.

Yüksek lisansa başlama kararımı her fırsatta destekleyen, hiçbir zaman beni yalnız bırakmayan canım aileme ne kadar teşekkür etsem az kalır. Bana inanan, sevgisini ve desteğini kalbimde hissettiğim, dağıldığımda beni toplayıp ayağa kaldıran, beni yetiştiren annem ve babam Gülşen-Mahmut SULUTAŞ'a minnettarım. Beni hep telkin eden, yüzümü güldüren canım kardeşim Atilla Kağan SULUTAŞ'a teşekkür ederim.

Henüz stajyerken bana inanan, aklıma lisansüstüne başlama fikrinin tohumlarını eken, cesaretini veren hocam ve danışmanım kıymetli Dr. Öğretim Üyesi Sümeyye CESUR'a gönülden teşekkür ederim. Hem insanlığını hem akademisyenliğini örnek aldığım hocamın rehberliğine, güler yüzüne, çalışma disiplinine, anlayışına minnettarım.

Laboratuvarında her imkânı sunan, tecrübelerini, birikimlerini paylaşan, ERASMUS projesiyle Fas'a gitmeme vesile olan ve teşvik eden eş danışmanım Prof. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecim boyunca aynı projede çalışmaktan çok memnun olduğum, bir sürü şey öğrendiğim, tez sürecimde sorularıma her zaman cevap veren çözüm odaklı, güler yüzlü hocam Dr. Elif İLHAN'a bu süreçteki yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim. Tez makaleme katkıda bulunan hocalarım Doç. Dr. Serap AYAZ SEYHAN, Doç. Dr. Dilek BİLGİC ALKAYA, Dr. Öğr. Görevlisi Ali ŞAHİN, Doç. Dr. Nazmi EKREN'e teşekkür ederim.

Uzakta bile olsak elini hep omzumda hissettiğim, liseden bu yana sevincime, kederime ortak, duası her daim benimle olan arkadaşım Ümran YILMAZ'a teşekkür ederim. İstanbul'a geldiğim ilk zamanlar tanıdığım, çok sevdiğim, bana hep inanan, hayallerime ortak olan, dualarını her yerde kalben hissettiğim bir başka arkadaşım Sanaa AMIR AHAMADA OU'ya ve aynı evi paylaştığım, beni hiç yalnız bırakmayan, hep yüreklendiren, İstanbul'da ailem olan biricik dostum Ayşe ÖZKAN'a teşekkür ederim.

Günün uzun saatleri aynı çalışma ortamını paylaştığımız, desteğini, yardımını esirgemeyen Marmara Üniversitesi Nanoteknoloji ve Biyomalzeme Uygulama ve Araştırma merkezi (NBUAM) ekibine bütün içtenliklerimle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
SEMBOLLER	viii
KISALTMALAR	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xii
Tablo 1. Solüsyon bileşen ve orsınları.....	25
.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser Hastalığı Nedir	1
1.2. Kanser Nasıl Oluşur	1
1.3. Kanser tipleri	2
1.3.1. Beyin ve Spinal Tümörler.....	3
1.3.3. Lösemi	3
1.3.4. Lenfoma.....	4
1.3.5. Multipl Miyelom	4
1.3.6. Melanom.....	5
1.3.7. Karsinom	5
1.4. Tedavi Amaçlayan Yaklaşımlar	7
1.5. Kanser Tedavisinde İlaç Taşıyıcı Yapılar	8
1.5.1. Polimerik Misel Formlu Yapılar	8
1.5.2. Polimerik Nanopartiküller	9
1.5.3. Lipozomlar	10
1.5.4. Dendrimers	10
1.5.5. Karbon Nanotüp Formlu Yapılar.....	11
1.5.6. Nanofiber Boyutlu Doku İskeleleri	12
1.5.6.1 Yağda Çözünür İlaç Yüklü Nanofiberler	13
1.5.6.2 Suda Çözünür İlaç Yüklü Nanofiberler	13
1.5.6.3 Protein Yüklü Nanofiberler	14
1.5.6.4 Gen Taşınımı Nanofiberler.....	14
1.6. Üretim Yöntemleri.....	15
1.6.1. Eklemeli İmalat.....	15
1.6.2. 3 Boyutlu Basım Teknolojisi.....	15

1.6.3.	Elektro-eğirme Yöntemi	16
1.7.	Polimerler	18
1.7.1.	Polilaktik asit	18
1.7.2	Polivinil prolidon.....	18
1.8.	Etken Maddeler.....	19
1.8.1.	Amigdalın	19
1.8.2.	<i>Inula helenium (I.H)</i>	20
2.	MATERYAL VE YÖNTEM	21
2.1.	Malzemeler	21
2.1.1.	PLA.....	21
2.1.2.	PVP.....	21
2.1.3.	AMG.....	21
2.1.4.	<i>I.H</i>	21
2.1.5.	Kloroform	21
2.1.6.	Etanol.....	21
2.1.7.	DMSO.....	21
2.1.8.	Tween 80	22
2.2.	<i>I.H</i> Bitki Ekstraktının Elde Edilmesi.....	22
2.3.	Çözeltilerin Hazırlanması	23
2.3.1	Polimer Çözeltilerinin Kombinasyonu ve Optimizasyonu.....	23
2.3.2	PLA/PVP/ <i>I.H</i> Çözeltisinin Hazırlanışı	24
2.3.3	PLA/PVP/AMG Çözeltisinin Hazırlanışı.....	25
2.4	Elektro-eğirme Yöntemiyle Nanofiber Üretimi	26
2.5.	Üretilen Nanofiberlerin Karakterizasyonu	27
2.5.1.	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	27
2.5.2.	Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	28
2.5.3.	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi (DSC)	29
2.5.4.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)	30
2.5.5.	Mekanik Analiz	30
2.5.6.	Şişme-Bozunma Testi.....	31
2.5.7.	<i>İn-vitro</i> İlaç Salım Testi.....	32
2.5.8.	<i>İn-vitro</i> Sitotoksikite Analizi	33
2.5.8.1	DAPI Boyama Testi	34
2.5.8.2	Hücre Tutunmasının Morfolojik Analizi.....	35
3.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	35
3.1.	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	35

3.2.	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrum Analizi (FTIR).....	38
3.3.	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi (DSC)	40
3.4.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi HPLC.....	41
3.5.	Mekanik Analiz	43
3.6.	Şişme-Bozunma Testi.....	44
3.7.	<i>İn-vitro</i> İlaç Salım Testi.....	46
3.8.	<i>İn-vitro</i> Sitotoksisite Analizi	48
3.8.1.	DAPI Boyama Testi	50
3.8.2.	Hücre Tutunmasının Morfolojik Analizi.....	51
4.	SONUÇLAR.....	53
5.	KAYNAKLAR.....	54



ÖZET

ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİ İLE KANSER TEDAVİSİNE YÖNELİK *INULA HELENİUM* EKSTRAKTI VE AMİGDALİN YÜKLÜ NANOFİBERLERİN ÜRETİMİ

Kanser hastalığı dünya çapında en yaygın ölüm sebebi olarak tanımlanmaktadır ve küresel boyutta bir sağlık problemidir. Kanser türleri arasında en sık görülen kolon kanseri, ölümcül kanserler içerisinde yer almaktadır. Kanser tedavisi için nanoteknolojik yöntemlerle üretilen biyomalzemeler, mevcut tedavi stratejilerinden daha etkili ve tamamlayıcıdır. Nanofiber yapı iskeleleri, kanser tedavisinde kullanılabilen, biyouyumlu polimerler ve kanser önleyici ilaçlar, bitki ekstraktları ile kompozitler halinde üretilen biyomateryallerdir.

Bu çalışmada lokal kolon kanseri nüksetmesini önlemek amacıyla elektro-eğirme yöntemiyle amigdalin (AMG) ticari ilacı ve *Inula helenium* (*I.H*) bitki ekstraktı yüklü polilaktik asit (PLA) ve polivinil pirolidon (PVP) polimerlerinden oluşan nanofiberler üretilmiştir. Üretilen nanofiberlerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri incelendiğinde PLA/PVP grubunun fiber çapı $443,74 \pm 79$ nm olarak ölçülmüştür ancak *I.H* bitki ekstraktı ve AMG ilacının ilavesi fiber çaplarında kalınlaşma etkisi yaratmıştır. UV Spektrofotometre ile yapılan ilaç salım sonuçları, *I.H* bitki ekstraktı ve AMG ilacı yüklü nanofiberli yamaların 180 saat içinde kontrollü salım periyodunu göstermektedir. *İn-vitro* sitotoksisite sonuçları analiz edildiğinde tüm nanofiberlerin HCT-116 kolon kanseri hücrelerine karşı sitotoksisiteyi tetiklemede etkili olduğu görülmüştür. En etkili grup *I.H* ekstraktı ve AMG ilacının birlikte nanofiber üzerine yüklendiği gruptur. *I.H* bitki ekstraktı ve AMG ilacı, *in-vitro* deneylerde kolon kanseri hücre dizisi üzerinde etki göstermiştir. Sonuç olarak bu tez çalışmasında yapılan testler ve deney sonuçlarına bakıldığında hem bir ticari ilacın hem de bir bitki ekstraktının farklı kombinasyonlarını nanofiber lif materyali formunda incelenmiştir, karşılaştırılmıştır ve katı tümör hücreleri üzerindeki lokal tekrarlanma riskinin azaltılması amaçlanmıştır.

Temmuz 2024

Rabia Betül SULUTAŞ

ABSTRACT

PRODUCTION OF *INULA HELENIUM* AND AMYGDALIN LOADED NANOFIBERS FOR CANCER TREATMENT BY ELECTROSPIN METHOD

Cancer disease is defined as the most common cause of death worldwide and is a global health problem. Colon cancer, the most common type of cancer, is among the deadly cancers. Biomaterials produced with nanotechnological methods for cancer treatment are more effective and complementary than existing treatment strategies. Nanofiber scaffolds are biomaterials that can be used in cancer treatment, biocompatible polymers and anti-cancer drugs, and can be produced as composites with plant extracts.

In this study, the effect of nanofibers consisting of polylactic acid and polyvinyl pyrrolidone polymers loaded with amygdalin (AMG) commercial drug and *Inula helenium* (*I.H*) plant extract by electrospinning method in order to prevent local colon cancer recurrence. When scanning electron microscope images were examined, the fiber diameter of the polylactic acid and polyvinyl pyrrolidone group was measured as 443.74 ± 79 nm, but the addition of *Inula helenium* plant extract and amygdalin drug caused a thickening effect on the fiber diameters. Drug release results using UV Spectrophotometry show the controlled release period of nanofibrous patches loaded with *Inula helenium* plant extract and amygdalin drug within 180 hours. When in-vitro cytotoxicity results were analyzed, it was seen that all nanofibers were effective in triggering cytotoxicity against HCT-116 colon cancer cells. The most effective group is the group in which *I.H* extract and AMG drug are loaded onto the nanofiber together. *I.H* plant extract and AMG drug showed effects on colon cancer cell line in in-vitro experiments. As a result, looking at the tests and experimental results performed in this thesis study, different combinations of both a commercial drug and a plant extract in the form of nanofiber fiber material were examined and compared and it was aimed to reduce the risk of local recurrence on solid tumor cells.

July 2024

Rabia Betül SULUTAŞ

SEMBOLLER

μm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
cm	: Santimetre
kV	: Kilovolt
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
MPa	: Mega paskal
Mw	: Moleküler Ağırlık
g	: Gram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
cm	: Santimetre
°C	: Santigrat Derece
pH	: Hidrojen Potansiyeli
ml/s	: Mikrolitre/saat
$\mu\text{g}/\text{gr}$: Mikrogram/gram
%	: Yüzde
mm	: Milimetre
dk	: Dakika
°C	: Santigrad derece

KISALTMALAR

DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
PLA	: Polilaktik Asit
PVP	: Polivinilpirolidon
I.H	: <i>Inula helenium</i>
AMG	: Amigdalın
KHK	:Kanser kök hücresi
Tg	: Camsı Geçiş Sıcaklığı
Tm	: Erime Sıcaklığı
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol,
HDM	:Hücre dışı matriks
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
MTT	: Metiltiazol Difenil Tetrazolyum
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
UV	: Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	Kanser tipleri.....	3
Şekil 1.2	Kolon kanseri oluşum evreleri [2].....	7
Şekil 1.3	Polimerik misel formu yapı [37].....	9
Şekil 1.4	Polimerik nanopartiküller [41].....	9
Şekil 1.5	Lipozom yapı [43].....	10
Şekil 1.6	Dendrimer yapı [45].....	11
Şekil 1.7	Karbon nanotüpler [47].....	12
Şekil 1.8	elektro-eğirme prosesi.....	17
Şekil 1.9	PLA polimerinin kimyasal yapısı [84].....	18
Şekil 1.10	PVP polimerinin yapısı [88].....	19
Şekil 1.11	AMG ilacının kimyasal yapısı [92].....	19
Şekil 1.12	<i>I.H</i> bitkisinin kimyasal yapısı [97].....	20
Şekil 2.1.	Andız bitki ekstraksiyon prosesi.....	22
Şekil 2.2.	Üç farklı karışım oranında denen PLA/PVP fiberleri. (a) 75:25 oranı, (b) 25:75 oranı, (c) 50:50 oranı.....	24
Şekil 2.3.	<i>I.H</i> çözeltilisinin hazırlanışı. a) bitki ekstraktının kurutma işleminden önceki formu, b) bitki ekstraktının kurutma işleminden sonraki formu, c) PLA polimeri d) <i>I.H</i> içeren PLA solüsyonu.....	25
Şekil 2.4.	AMG çözeltilisinin hazırlanışı. a) PVP, b) ticari AMG ilacı, c) AMG içeren PVP solüsyonu.....	25
Şekil.2.5.	a) Elektrosin cihazı, b) pompa ve şırınga.....	27
Şekil 2.6.	a) Kaplama cihazı ve b) Taramalı elektron mikroskobu.....	28
Şekil 2.7.	FTIR cihazı.....	29
Şekil 2.8.	a) DSC cihazı, b) numunelerin cihazda yerleştirildiği kısım, c) numunelerin içine konduğu alüminyum yuva.....	29
Şekil 2.9.	a) Mekanik analiz için çekme-basma cihazı, b) çekme testinin yapıldığı parça.....	31
Şekil 2.10.	Termal çalkalayıcı.....	32
Şekil 2.11.	a) UV spektrofotometre cihazı, b) salım numunesinin cihazda yerleştirildiği yuva, c) salım numunesinin transfer edildiği kristal küvet.....	33
Şekil 2.12.	Hücre canlılık testi a) steril kabin, b) mikropilaka okuyucu cihaz.....	34
Şekil 2.13.	Floresan mikroskobu.....	35
Şekil 3.1.	A) ve B) 25PLA/75PVP, C) ve D) 50PLA/50PVP, E) ve F) 75PLA/25PVP oranlarından elektro-eğirme yöntemi ile üretilen fiber gruplarının morfolojileri için SEM görüntüleri.....	36
Şekil 3.2.	Nanofiberlere ait morfolojik görüntüler ve çap dağılımları. A) 75PLA/25PVP, B) 75PLA/25PVP/ <i>I.H</i> , C) 75PLA/25PVP/AMG D) 75PLA/25PVP/ <i>I.H</i> /AMG/(K), E)	

75PLA/25PVP/ <i>I.H</i> /AMG (ÇK)	37
Şekil 3.3. (A) a) saf PLA, b) saf PVP, c)AMG ilacı, d) <i>I.H</i> bitkisinin FTIR spektrumları. (B) e)75PLA/25PVP, f) 75PLA/25PVP/ <i>I.H</i> , g) 75PLA/25PVP/AMG, h) 75PLA/25PVP/ <i>I.H</i> /AMG (K), j)75PLA/25PVP/ <i>I.H</i> /AMG (ÇK) nanofiberlerin FTIR spektrumları	39
Şekil 3.4. Nanofiberlerin DSC eğrileri.....	41
Şekil 3.5. Ekstraktın ve standartın 278 nm’de HPLC kromatografisi. (A) Pik 1: gallik asiti pik 2: klorojenik asit, pik 3: p-kumarik asit, pik 4: rutin, pik 5: sinamik asit ve pik 6: kuersetin	42
Şekil 3.6. Çekme mukavemeti (MPa) ve Kopma gerinim (%) grafikleri.....	44
Şekil 3.7. Şişme testi grafikleri	45
Şekil 3.8. Bozunma testi grafikleri	46
Şekil 3.9. a) Amigdalin ilacının UV absorbans spektrumları, b) 218nm’de amigdalinin standart eğrisi, c) Amigdalin yüklü nanofiberin <i>in-vitro</i> salım eğrisi 0-200 saat aralığı, d) Amigdalin yüklü nanofiberin <i>in-vitro</i> salım eğrisi 0-5,5 saat aralığı.....	47
Şekil 3.10. a) <i>I.H</i> bitki ekstraktının UV absorbans spektrumları, b) 345nm’de <i>I.H</i> bitki ekstraktının standart eğrisi, c) <i>I.H</i> yüklü nanofiberin <i>in-vitro</i> salım eğrisi 0-200 saat aralığı, d) Amigdalin yüklü nanofiberin <i>in-vitro</i> salım eğrisi 0-6 saat aralığı.....	48
Şekil 3.11. Nanofiberlerin 1, 3 ve 7 günlük hücre canlılık testi.....	50
Şekil 3.12. DAPI boyama yöntemiyle nanofiberlere ait 7 günlük floresan görüntüleri. 51	
Şekil 3.13. Nanofiberlere ait 3 ve 7 günlük hücre tutunma analizi sonucunun taramalı elektron mikroskop (SEM) sonuçları	52

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Solüsyon bileşen ve orsınları.....25



1. GİRİŞ

1.1.Kanser Hastalığı Nedir

Dünya genelinde kanser ve kanser türevleri gelmiş geçmiş en önemli ölüm sebeplerinden biridir. Yapılan tahminlere göre 2018 yılına kadar 18.1 milyon yeni kanser vakasının meydana gelmesi ve 9.6 milyon kansere bağlı ölümün gerçekleşmesi beklenmiştir. İçinde bulunduğumuz 2024 yılı için ise sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde 2.001,140 yeni kanser vakasının ve 611.720 kanser ölümünün meydana geleceği öngörülmektedir [1]. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre, kanser vakaları orta bölgeye kıyasla dünyanın uzak kuzey ve güney bölgelerinde önemli ölçüde artmaktadır [2]. Kanser kontrolsüz hücre çoğalması sebepli bir hastalıktır. Kontrolsüz hücre çoğalması ile karakterize edilen kanser hastalığı başlangıçta bir odak noktasından vücudun farklı bölgelerine yayılarak ölüme sebebiyet veren bir hastalık olarak bilinmektedir. Hastalığın vücut içerisinde yayılmasını ve ölüme sonuçlanma oranını azaltmak için erken tanı tespiti yapmak çok önemlidir [3]. Kansere sebebiyet veren kontrolsüz hücre bölünmelerinin sonucu olarak meydana gelen hücre topluluğuna tümör denir. Bu şekilde tümörleşen hücreler vücuttaki reaksiyonlarına göre iyi huylu ve kötü huylu tümör kavramlarına ayrılmıştır. İyi huylu tümörleşen hücreler istilacı bir şekilde büyürler. Tek başına kanserin bir göstergesi olmayan bu tümörler vücutta yayılmadıkları için metastaz yapmazlar çünkü oluştukları bölgede lokalize bir şekilde kalırlar [4]. Kötü huylu tümörlere kıyasla daha yavaş büyürler. Etraflarını saran ve çevreleyen bir kapsüle sahip oldukları için komşu dokularla sınırlı etkileşim gösterirler. Kötü huylu tümörler daha hızlı büyümeye eğilimli bir davranış sergilerler. Köken aldıkları bölge ile sınırlı kalmayarak dislokale bir şekilde metastaz gibi moleküler mekanizmalarında oluşan değişim sonucu farklı dokulara ve bölgelere yayılabilir [5][6].

1.2.Kanser Nasıl Oluşur

Kanser hücrelerin işleyişini, büyümesini ve bölünme şeklini kontrol eden genlerde oluşan değişimler yüzünden ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Hücre bölünmesi esnasında DNA'da meydana gelen hatalar, genellikle güneş ışınları sebepli UV maruziyeti, kimyasal maddeler, genetik yatkınlık gibi pek çok unsur kansere sebep olur. İnsan vücudunun onarım mekanizması DNA'da hasar görmüş kısımları kansere dönüşmeden önce

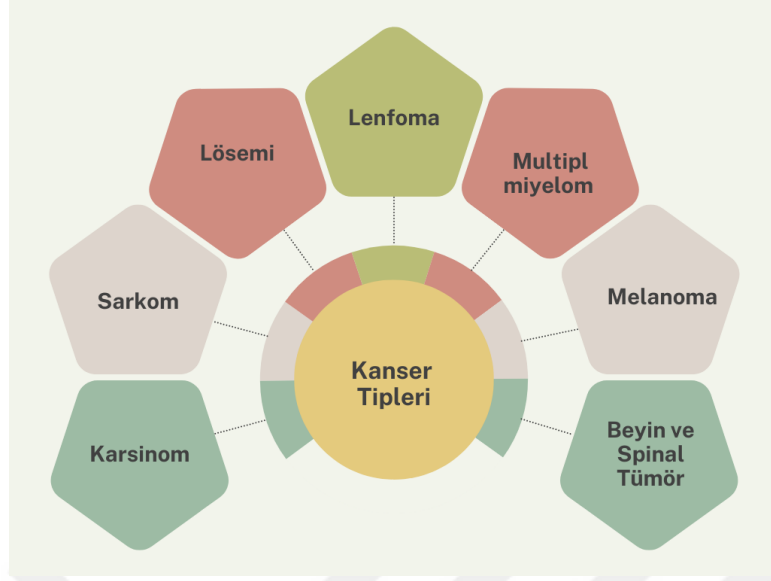
onarabilme özelliğine sahiptir ancak insan vücudu yaşlandıkça onarım mekanizmasının işlevinde azalma görülür. Bu yüzden insan hayatının orta yaş ve üzeri dönemlerinde kanser türlerinin oluşma riskinin artması yaş ile paralellik gösterebilir [7].

Kanser kişilerin genetik benzersizlikleri gibi farklı kombinasyona sahip bir oluşum mekanizması ile çalışır. Aynı tümör içerisinde bulunan farklı hücrelerde farklı genetik değişimler görülebilir [8].

Kanserin meydana gelmesinde rolü olan genetik değişiklikler üç ana gen tipini değiştirme eğilimindedir. Proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleri olarak tanımlanan bu genlere kanser “tetikleyici” denir. Proto-onkogenler normal hücre büyümesini ve bölünmesini sağlar. Bu genlerin belirli şekillerde değişimi kansere neden olmaktadır. Ya da proto-onkogenler hücre içinde normalden daha aktif hale gelme durumunda kansere dönüşebilen genlere evrilerek hücrelerin fazla büyümesine ve gereğinden fazla hayatta kalmalarına yol açabilir. Tümör baskılayıcı genler hücre büyümesinde ve çoğalmasında görevlidir[9]. Bu genlerde oluşan değişiklikler kontrolsüz hücre bölünmesine sebebiyet verebilir. DNA da oluşabilecek potansiyel hataları düzeltme fonksiyonu olan DNA onarım genleri mutasyon bulunan genlerde ek mutasyon oluşuna sebep olabilir. Benzer şekilde kromozomlarda bulunan kromozom parçalarının kopyalanması veya silinmesi gibi değişimler yapabilme eğilimindedir. Bu eğilim hücrelerin kanser formuna dönmesine yol açabilir [10].

1.3.Kanser tipleri

Kanser türleri 100’den fazladır ve bu türler genellikle kanserin oluşturduğu doku veya organ ismine göre isimlendirilir. Bu kanser tipleri oluşum şekline göre karsinom, sarkom, lösemi, lenfoma, multipl miyelom, melanoma, beyin ve spinal tümör olarak çeşitli sınıflara ayrılmıştır (Şekil 1.1.) [11].



Şekil 1.1 Kanser tipleri

1.3.1. Beyin ve Spinal Tümörler

Beyin tümörü spinal (omurilik) tümörlerin farklı türleri vardır. Bu türler tümörün oluştuğu hücre tipi ve insan merkezi sinir sisteminde ilk oluşum görülen bölgeye göre çeşitlilik kazanmaktadır. Beyin tümörleri iyi huylu (benign) ya da kötü huylu tümör (malignant) olabilirler [29].

1.3.2. Sarkom

Kas doku, yağ doku, kan damarları, lenf damarları, fibröz dokular (tendon) gibi bölgelerde oluşan yumuşak doku kanseri sarkom grubundadır. Osteosarkom yaygın görülen kemik kanseridir.

Sarkomlar, kas, yağ, kan damarları, lenf damarları ve fibröz doku (tendonlar ve bağlar gibi) dahil olmak üzere kemik ve yumuşak dokularda oluşan kanserlerdir [14]

1.3.3. Lösemi

Lösemi beyaz kan hücreleri, kırmızı kan hücreleri ve trombositleri içeren kemik iliğinde kan yapıcı dokuda meydana gelen kanser türüdür. Katı tümör yerine anomali taşıyan (lösemik patlama hücreleri) beyaz kan hücresi birikimiyle oluşur. Kan ve kemik iliğinde birikimi artan beyaz anomal kan hücrelerinin normal kan hücrelerinden sayıca üstün olduğu durumda vücut dokularına kanla taşınan oksijenin engellenmesi, kanama ve

pıhtılaşma mekanizmasında hakimiyet kaybı ve dolayısıyla enfeksiyonlara karşı mücadele edememe gibi etkenler lösemiye fiilen başlatan sebeplerdir [15]–[17].

Kemik iliğinin kan yapıcı dokusunda başlayan kanserlere lösemi denir. Bu kanserler katı tümörler oluşturmazlar. Bunun yerine, kanda ve kemik iliğinde çok sayıda anormal beyaz kan hücresi (lösemi hücreleri ve lösemik patlama hücreleri) birikerek normal kan hücrelerini geride bırakır. Normal kan hücrelerinin düşük seviyesi, vücudun dokulara oksijen gitmesini, kanamayı kontrol etmesini veya enfeksiyonlarla savaşmasını zorlaştırabilir. Kanseri başlatan kan hücresi grubuna göre yaygın görülen dört kısma ayrılır: akut lösemi, kronik lösemi, lenfoblastik lösemi, miyeloid lösemi. Akut lösemi hızlı büyüme gösterir [18], [19].

1.3.4. Lenfoma

T hücreleri veya B hücreleri bir lökosit türü olan lenfositlerde bulunur. Lenfositler en genel özelliği itibariyle vücudun bağışıklık sisteminde önemli role sahip olan savaşçı beyaz kan hücreleridir [20]. Tıp dilinde lenf kanseri olarak isimlendirilen lenfoma anormal lenfositlerin lenf düğümlerini ve lenf damarlarını ele geçirerek birikmesidir. Lenfoma Hodgkin lenfoma ve Hodgkin olmayan lenfoma olarak iki ana türden oluşur. Hodgkin lenfoma da Reed-Sternberg hücreleri bulunur. Bu anormal hücreler genellikle B hücrelerinden oluşur. Hodgkin olmayan lenfoma B hücrelerinden veya T hücrelerinden oluşan anormal hücrelerin barındığı kitlesel bir kanser grubudur. Hızlı ya da yavaş büyüyebilir [21], [22].

Lenfoma, lenfositlerde (T hücreleri veya B hücreleri) başlayan kanserdir. Bunlar bağışıklık sisteminin bir parçası olan hastalıklarla savaşan beyaz kan hücreleridir. Lenfomada anormal lenfositler, vücudun diğer organlarının yanı sıra lenf düğümlerinde ve lenf damarlarında da birikir [23].

1.3.5. Multipl Miyelom

Plazma hücreli miyelom ya da Kahler hastalığı olarak bilinen kanser türünde miyelom hücreleri olarak bilinen anormal plazma hücreleri kemik iliğinde birikir ve vücudun her noktasında bulunan kemiklerde tümörler oluşturur. Bu kanserin başlangıcı bağışıklık hücre türü olan plazma hücreleridir [24], [25].

1.3.6. Melanom

Cilde renk veren melanin pigmentlerinde görülen kanser türüdür. Melanositler melanin üreten özel hücrelerin dönüştüğü yapıdır ve melanom kanseri bu hücrelerde başlar. Melanom genellikle ciltte görünmesine rağmen bazı melanom tipleri göz gibi pigmentli yapıya sahip dokularda da tespit edilebilir [26]–[28].

1.3.7. Karsinom

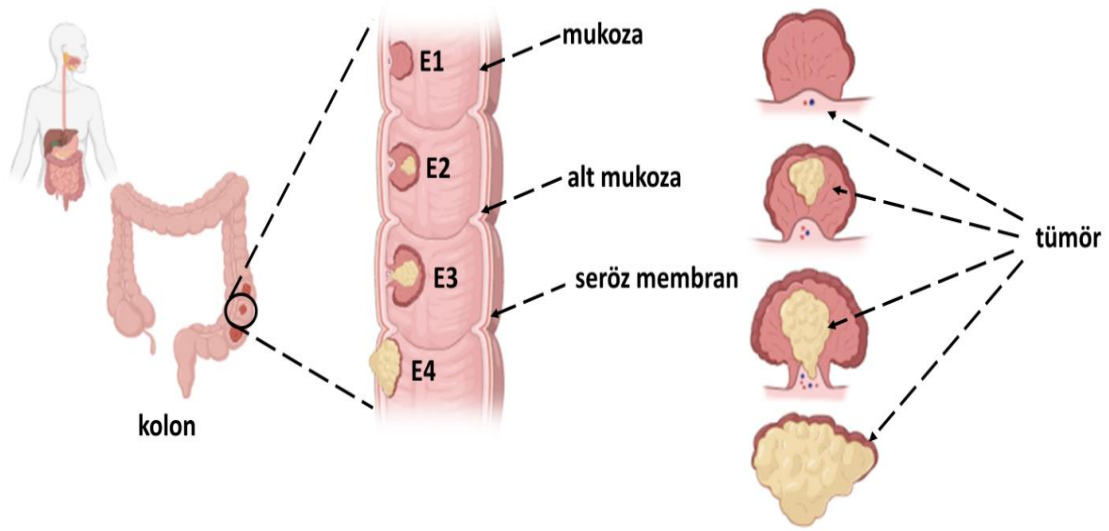
En sık görülen kanser türü olan karsinomlar epitel hücreleri tarafından meydana gelir. Karsinomlar farklılaştıkları epitel hücre tiplerine göre çeşitli alt gruplara ayrılır. Adenokarsinom vücutta sıvı veya mukus gibi metabolik salgıları üreten epitel hücrelerde görülür. Meme kanseri, kolon kanseri, prostat kanseri gibi kanserler adenokarsinom grubuna girer. Bazal hücreli karsinom vücudun deri tabakasının dış katmanı olan epidermisin alt tabakasında görülen bir kanserdir. Skuamöz hücreli karsinom deri tabakasının dış kısmında bulunan skuamöz hücrelerinde meydana gelen bir kanserdir. Mide, bağırsak, akciğer, mesane, böbrek gibi organların dış yüzeyinde bulunan skuamöz hücreleri epitelyal hücreler olduğu için epidermoid karsinom olarak da isimlendirilir [12]. Transizyonel ya da diğer ismiyle geçiş hücreli karsinom ürotelyum epitel dokuda oluşur. Mesanenin, üreterin, böbrek pelvisinin iç yüzey tabakasında yer alır. Burada oluşan tümörler geçiş hücreli ya da transizyonel kanserlerdir [13].

1.3.7.1. Kolon kanseri

Kolon kanseri dünya çapında ölüme sebep olan, en sık görülen kanser türlerinden biridir. Bu kansere yakalanma riski yaşla birlikte arttığı gibi vakaların çoğu 50 yaş ve üzeri insanları etkilemektedir [30]. Kolon kanseri, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin arasında ikinci sırada yer alır. Hastalığın insidans oranı Avrupa, Avustralya ve Yeni Zelanda olarak seyrederken en yüksek ölüm oranı Doğu Avrupa ülkelerinde görülmüştür. 2040 yılı için yapılan öngörülerde kolon kanser yükü yılda %63 artışla 3,2 milyon vakada insidans edeceğken %73 artışla 1,6 milyon ölüme sebebiyet verecektir. Bu kanser türü Türkiye’de erkek ve kadınlarda en sık görülen üçüncü kanser olma oranına sahiptir [31]. Yaygın semptomları ishal, kabızlık, dışkıda kan, karın ağrısı, açıklanamayan kilo kaybı,

yorgunluk ve kanda görülen düşük demir seviyesidir. Bu semptomlar birçok kişide hastalığın erken evrelerinde görünmeyebilir.

Kolon kanserinin duvarlarda veya organlarda ne kadar ilerlediğini 4 farklı aşamada ifade edebiliriz. Bu aşamalar şu şekildedir: İlk evre olarak sayılan sıfıncı evre, en erken evreyi tanımlar. Kolonun mukoza ile çevrelenmiş bölümünde veya en iç tabakasında büyüme olmadığı anlamına gelir. Malignite ilk aşamada submukozaya ulaşır ancak lenf bezlerine ilerlemez. Daha sonraki zaman periyodunda malignite yapı tümör tipi gelişim gösterir fakat lenf düğümüne sıçrama yapma evresi burada gerçekleşmez. Bu aşamada üç alt grup vardır: evre 2A, kolonun dış katmanlarına doğru ilerlediği ancak büyümenin tam olarak gerçekleşmediği evredir. Evre 2B, bu tümörün visseral peritona ulaştığı evredir. İkinci evrenin alt gruplarındaki son aşaması olan 2C'de kolon kanser hücresinin yakındaki organlar veya yapılar üzerinde büyüdüğü aşamadır. Üçüncü evrenin de üç alt kategorisi vardır. Aşama 3A'da tümör yakındaki lenf düğümlerine yayılır ve aşama 3B'de kaç lenf düğümüne ulaşıldığına bağlı olarak üç, dört veya daha fazla olmak üzere iki sınıflandırma vardır. Aşama 3C, tümörün kas katmanlarının dışına büyüdüğünü ve dört veya daha fazla bitişik lenf düğümünde etkilenen bölgede bulunduğunu belirtir. Sonuncu evre ise 3 farklı aşamadan oluşan dördüncü evredir. Aşama 4A'da malignite yayılım gösterme aşamasına geçerek karaciğer, akciğerler veya lenf düğümleri gibi yakın olmayan bir bölgeye taşınır. Aşama 4B, hem birden fazla hem daha uzak bölgeye ulaştığı zamandır; bu sürecin finalinde evre 4C'de ilerleme göstermiştir ve kanserin karın zarına uzanım yapmıştır [2].



Şekil 1.2 Kolon kanseri oluşum evreleri [2]

1.4.Tedavi Amaçlayan Yaklaşımlar

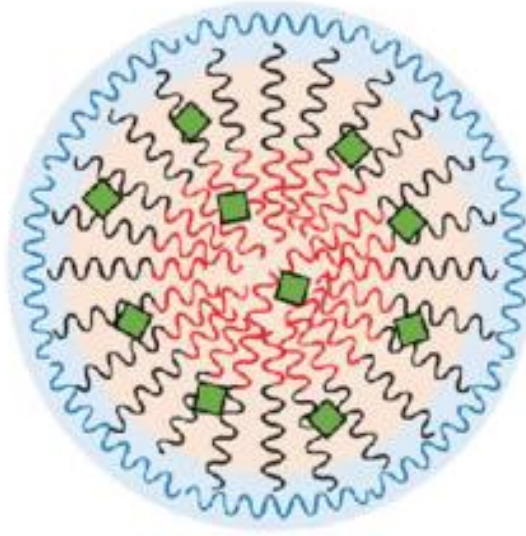
Kolon organı malignite tanısı alan hastalara yönelik geçmişten günümüze pek çok tedavi türü vardır. Tedavi yöntemleri aynı zamanda kanserin evresine ve durumuna da bağlıdır. Henüz primer tümörlerin oluştuğu çok erken evrelerde tedavisi kolaydır çünkü hastalık çok şiddetli seyretmez ve buna bağlı olarak hastanın iyileşmesi uzun bir süreye ihtiyaç duymaz. Ancak malignite hücreleri tanı konduktan çok sonraki bir aşamada vücudun farklı yerlerinde bulunduğundan tedavi kompleks ve uzun zaman alacaktır. Üstelik bazı durumlarda iyileşme için tedavi planı iki veya üç tür tedaviyi gerektirebilir. Kolon kanseri tedavisinin temel taşı cerrahidir ve hastaların prognozunu iyileştirmek için adjuvan kemoterapi rutin olarak uygulanır. Ancak kemorezistans kolon kanseri tedavisini engelleyen en önemli sorunlardan biridir. Kanser kök hücrelerinin (KKH'ler) varlığı kemoterapi başarısızlığına ve tümörün nüksetmesine yol açtığından, KKH'leri hedeflemek kolon kanserindeki terapötik etkinliği artırabilir. Bu nedenle, kolon kanserininin kökünü kontrol eden moleküllerin araştırılması, kolon kanseri için terapötik hedefler sağlayacaktır [32].

1.5. Kanser Tedavisinde İlaç Taşıyıcı Yapılar

Geleneksel ve modern tekniklerle üretilen ilaç taşıyıcı mekanizmalar geçmişten günümüze tedavilerde kullanılır [27]. Polimerik misel formulu yapılar, nanopartiküller, lipozomlar, dendrimerler, karbon nanotüp formulu yapılar ve nanofiberler alternatif taşıma sistemlerini oluşturur.

1.5.1. Polimerik Misel Formlu Yapılar

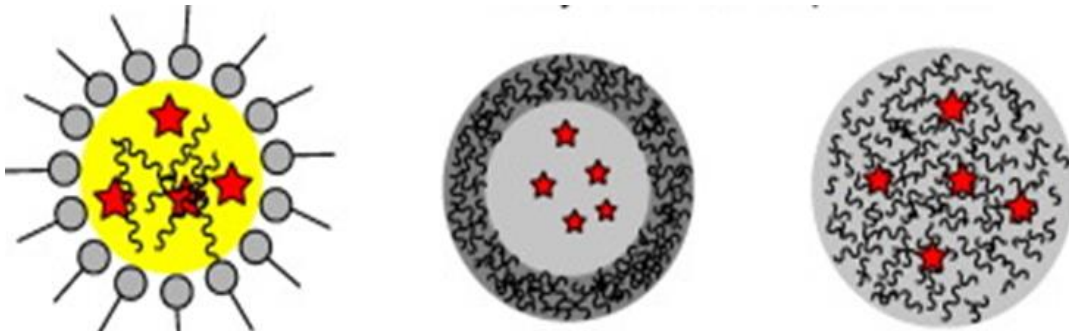
Polimerik formulu miseller (PM'ler), hidrofilik bir kabuğa ve hidrofobik bir çekirdeğe sahip, küresel, nano ölçekli koloidal parçacıklardır. Bu forma sahip olmak için bazı amfifilik kopolimerlerden sentez söz konusudur. PEG, hidrofilik kabuğun yapımında en çok kullanılan polimerdir; bu, taşıyıcıları etken maddeyi stabilize etmeye spesifik olmayan etkileşimleri azaltarak onları bozunmaya karşı korumaya yardımcı olabilir. Hidrofobik çekirdeği oluşturmak için polisakkaritler, poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), poli(laktit) (PLA) ve poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) dahil olmak üzere çeşitli doğal veya sentetik polimerler sıklıkla kullanıma dikkat çekilmiştir [34]. Hidrofobik çekirdeğin hidrofobikliği, hidrofobik ilaçları hapsetmek için mükemmel bir ortam sağlayarak bunların suda zayıf çözünürlükte olmasına yardımcı olur. Hidrofobik ilaçların zayıf çözünme yeteneğinin yanı sıra, dar dağılımlı küçük boyut, polimerik miselleri ideal nano ilaç dağıtım sistemleri haline getirir, çünkü hızlı böbrek atılımını önleyebilir ve uzun bir dolaşım süresinin gerçekleştirilmesine yardımcı olabilir [35]. Polimerik forma sahip miselleri ideal nano ilaç dağıtım mekanizması haline getiren sebepler olarak bu formda yapıların dar dağılımlı ufak boyut ve hidrofobiteye sahip olması olarak sıralanabilir [36].



Şekil 1.3 Polimerik misel formu yapı [37]

1.5.2. Polimerik Nanopartiküller

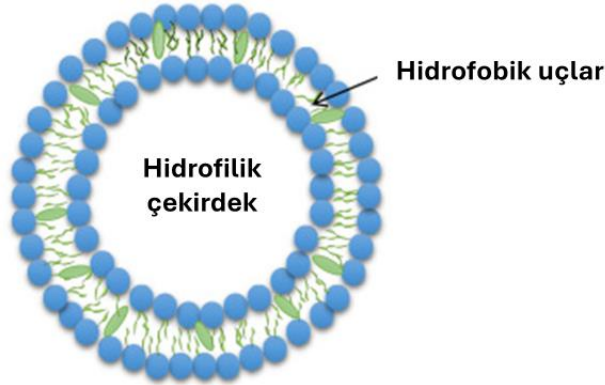
Nanotıp alanındaki en can alıcı noktalardan biri olan polimerik nanopartiküllerin (NP) polimerik miseller ile karşılaştırıldığında ilaç yükü ve ilaç stabilitesi dahil olmak üzere üstün farmakokinetik özellikler sunmasıdır. İlaçların emilimi, çözünme, tutulma ve kapsüllemesi amacına hizmet eden polimer matris formuna sahip NP'ler uygun bir ortam yaratır. AGT etkisi yoluyla pasif hedefleme yoluyla antikanser tedavisinin terapötik etkisini artırabilirler [38], [39]. AGT etkisi artırılmış geçirgenlik ve tutma etkisi, belirli boyutlardaki moleküllerin (tipik olarak lipozomlar, nanopartiküller ve makromoleküler ilaçlar) tümör dokusunda normal dokularda olduğundan çok daha fazla birikme eğiliminde olduğu tartışmalı bir kavramdır [40].



Şekil 1.4 Polimerik nanopartiküller [41]

1.5.3. Lipozomlar

Kendiliğinden birleşebilir olan lipozom formu NP'lerin membran yapısı kapalıdır. Başlangıç kutbu hidrofildir ve bu uç fosfolipitlerin ayrışmasıyla dağılarak oluşmuştur. Diğer bir uçta yer alan kuyrukları ise hidrofobik anyonik/kasyonik uzun bir zincir yapıdadır. Yapısında hem suda çözünebilir ilaçların hapsedilmesini sağlarken aynı zamanda lipofilik ilaçların da tutunmasını başarır. Bunun için karakteristik lipit çift katmanı özelliğini taşır ve kullanılır. Bu spesifik yapıdaki lipozomlar, farklı ve çok çeşitte biyoaktif (enzim, nükleik asit) moleküllerin taşınımında öncü rol oynar. Bu biyoaktif taşınım rolü sebebiyle hedef bölgeler biyo-dağılım için oldukça etkili bir zemin sağlar. Bunu yapmak için lipozomlar ve doğal olarak oluşan, toksik olmayan fosfolipidler kullanılabilir. Genellikle fosfolipid kombinasyonu, amaçlanan ilaçla bir çözelti içinde lipozomlar oluşturmak için hidratlanır [42].

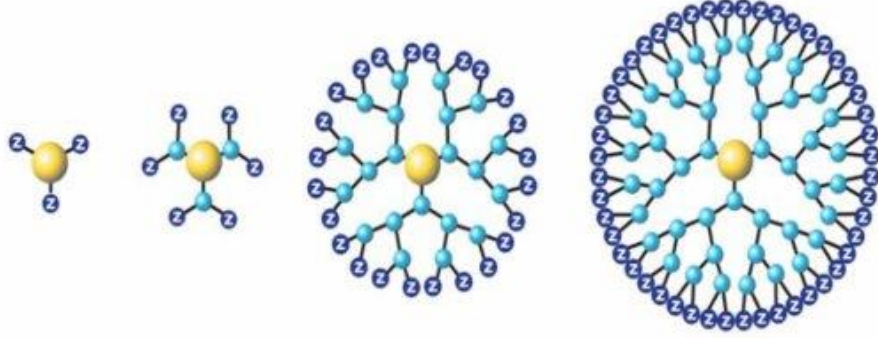


Şekil 1.5 Lipozom yapısı [43]

1.5.4. Dendrimers

Mükemmel monodispers makromoleküller olan dendrimerler, oldukça dallanmış bir 3D mimariyle karakterize edilmiştir. Dendrimer yapılar gen moleküllerini yüklenebilir ve bu yükleme için basit elektrostatik etkileşimler, kapsül yüklemesi ve kovalent konjugasyonlar metodsalsal olarak kullanılır. Dendrimerler içi boşluktan oluşan yapısal gözeneklere ve yüksek yoğunlukta yüzey fonksiyonel grubunu (-NH₂ veya -COOH) bünyesinde barındırır. Antitümör terapötikleri için ideal taşıyıcılar olan dendrimer formları

sayesinde taşıyıcı dendronlar üriner sistemde kandan kolayca ayrışabilir çünkü boyutlarının 1-15 nm arasında olması bu ayrışma için idealdir [44].

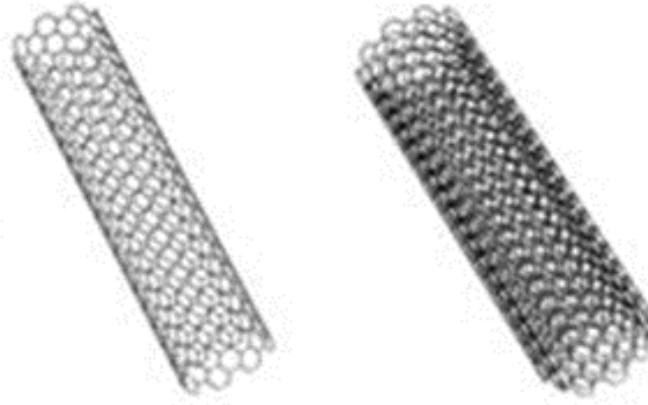


Şekil 1.6 Dendrimimer yapı [45]

1.5.5. Karbon Nanotüp Formlu Yapılar

Karbon nanotüp (KNT) formlu yapılar tek çeperli karbon nanotüpler ve çok çeperli karbon nanotüpler şeklinde sınıflandırılabilir. Son zamanlarda ilaç ve gen aktarımında kullanımı mümkün olan KNT'ler elektrik, termotik, optik ve mekanik özellikleri fotodinamik tedaviler ve termal tedaviler de dahil olmak üzere hemen hemen her yerde KNT'ler uygulanabilmektedir.

Elektrik, termotik, optik ve mekanik özelliklerinden dolayı kanser tedavilerinde kullanılan KNT'ler için ana sentez teknikleri ark deşarjı, lazer ablasyon ve kimyasal buhar biriktirme olarak uygulanabilir. Tüm yöntemler, KNT'leri oluşturmak için bir karbon ve enerji kaynağının kullanılmasını içerir. Ark deşarjı yönteminde karbon elektrotlar bir karbon kaynağı görevi görür; yaklaşık 20 V'luk bir potansiyel fark, bir enerji kaynağı görevi görür [46].



Şekil 1.7 Karbon nanotüpler [47]

1.5.6. Nanofiber Boyutlu Doku İskeleleri

Tarihi 1930'lara dayanan elektro-eğirme işlemi, birkaç nanometre ile mikrometre arasında çaplara sahip lifler oluşturmak için oldukça elverişli bir sistemdir.

Bu taşıyıcılar arasında nanofiberler ilaç sektöründe birçok avantaja sahiptir. Nanofiberler terapötik ajan dağıtım uygulamaları ve kanser tedavisi sorunlarına son derece başarılı çözümler sunmaktadır. Nanofiberler yalnızca kanserler için değil aynı zamanda diğer birçok hastalık için de terapötiklerin sağlanması için doğal veya sentetik veya her ikisi de olmak üzere polimerler kullanılarak üretilen, genellikle nanometre boyutunda filamentli veya iplik benzeri yapılardır. Hücre dışı matris (HDM) benzeri yapıya olan benzerlikleri, onları biyomedikal uygulamalar için daha çekici kılmaktadır. Bu avantajlardan bazıları üretimde basitlik, yüksek mekanik özellikler, kontrollü ilaç salım profili, yüksek yüzey alanı/hacim oranı, yan etkileri en aza indirme ve ilacın gücünü maksimuma çıkarma potansiyeli, sistemik serbest ilaç dağılımını azaltma yeteneğidir [48]. Nanofiberlerin geniş yüzey alanı ve mikro gözenekli yapısı, hücresel fonksiyonun modülasyonu için ilaçlar ve büyüme faktörleri gibi aktif biyomoleküllerin doğrudan dahil edilmesini sağlar ve bu, nanofiberleri çeşitli terapötik ajanların dağıtımını için bir araç olarak uygun hale getirir. Bu özellikler kapsülleme verimliliğini ve ilaç yükleme yeteneklerini artırıcı yönde etki sağlar. Spesifik bir teslimata ihtiyaç duyulduğunda nanofiberler, akış hızı, sıcaklık ve voltaj gibi işlem parametrelerini değiştirerek morfolojik yapılarının manipülasyonuna izin verir [49]. Karakteristik olarak nano boyutta malzemelerin doğal özelliklerinin bir

sonucu olarak iyileştirici özelliğe sahip malzemeler ve terapötik ajanların dağıtımını sağlayan taşıyıcı malzemeler bu yenilikçi tedavi yaklaşımlarına örnektir. Nanofiber bazlı ilaç taşıma sistemleri kolloidal stabiliteye, boyut ve yüzey fonksiyonelliğine sahiptir [50][51].

Elektron nanofiber membranlar, elektro-eğirme sırasında ilaç birleştirme kolaylığı, yüksek yüzeysel alan-hacim oranı, gözenekli ve birbirine bağlı mimari ve malzeme özelliklerindeki esneklik gibi avantajlı özellikleri sayesinde, çeşitli ilaçların taşınmasında taşıyıcı olarak kabul edilmektedir. Nanofiber doku iskeleleri yağda çözünür ilaç yüklü nanofiber, suda çözünür ilaç yüklü nanofiber, protein yüklü nanofiberler ve gen yüklü nanofiberler olmak üzere sınıflandırılır.

1.5.6.1 Yağda Çözünür İlaç Yüklü Nanofiberler

Küçük moleküllü antitümör ilaçların çoğunluğu hidrofobiktir, bu nedenle elektro-eğirme yöntemiyle üretilmiş yağda çözünebilen ilaç yüklü fiberlerin kanser tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı rapor edilmektedir. Bunun sebebi yağda çözünebilen fiberin yüksek çalışma verimliliği, azaltılmış toksisite ve geliştirilmiş terapötik etki gibi özellikleridir. Çalışmaların sonuçları, antikanser ilaçlarının nano elyafların içinde kapsüllendiğini gösterdi [52].

1.5.6.2 Suda Çözünür İlaç Yüklü Nanofiberler

Elektro-eğirme yöntemiyle elde edilen fiberlere çok çeşitli maddeler dahil edilebilse de, en az 7 güne kadar sürekli ilaç salımına ilişkin örneklerin çoğu, zayıf özellikleri nedeniyle sürekli salınmaya daha uygun olan küçük hidrofobik moleküllü ilaçlar veya büyük biyolojik makromoleküller ile sınırlıdır.

Buna karşılık, küçük hidrofilik moleküllü ilaçlar, salım ortamı içindeki yüksek çözünürlükleri, zayıf bölümlenmeleri ve hidrofobik olan birkaç polimerdeki düşük çözünürlükleri nedeniyle sürekli salım konusunda büyük bir zorlukla karşı karşıyadır. İlaç ve polimerin birbiriyle uyumlanması parçacıkların uzun süreli salınımının bir sonuçları ve tam kapsülleme sağlamayı içerir. Polar özellik gösteren bir solvent-polimer karışımında, düşük sıcaklıklara sahip küçük hidrofilik moleküllü aralıkta fiber çeşitlerinin olası bir bölünme parçalarını açığa çıkaracak sonuç şüphesi kontrolsüz bir salım periyodudur. Elektro-eğirme yöntemiyle üretilen fiberlerden yüklenen ve salınan küçük

hidrofilik moleküllü ilacı araştıran çalışmaların çoğunluğu antibiyotikler ve bazı antiviral bileşikler üzerine odaklanmıştır. Bununla birlikte, nanofiberler yapılar içeren ilaç taşıyıcı sistemlerin düzenli ve stabilize salınması, kanser tedavileri için kalıcı ve etkili bir çözüm önerisi olabilir [53].

1.5.6.3 Protein Yüklü Nanofiberler

Büyüme faktörleri (BF), hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanma ve yeni dokunun yenilenmesiyle sonuçlanan hücresel aktiviteleri teşvik etme yeteneğine sahip bir grup endojen proteindir.

Chew ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan b-sinir büyüme faktörünün etil etilen fosfat ve e-kaprolaktondan oluşan bir kopolimer içinde kapsüllenme performansı araştırıldığında sonuç, protein yapılı büyüme faktörünün difüzyon yoluyla sürekli salınması en az 3 ay sürdüğü görüldü. Kanser tedavilerinde kullanılmak üzere elektro-eğirme yönteminin iskelelerden büyüme faktörü salınımını uzatmak için verimli ve güvenilir bir yöntem olduğu söylenebilir [54].

1.5.6.4 Gen Taşınımı Nanofiberler

Kemoterapi ve kemoterapinin farklı kombinasyonları şu anda en sık kullanılan kanser tedavileridir. Ancak bu tedavi yöntemini en işlevsiz hale getiren olgu kullanılan ilaçların vücuda olumsuz etkileri göstermekle kalmayıp vücutta dolaşan diğer sağlıklı hücrelere ölümcül derecede zarar veriyor olmasıdır. Doku mühendisliği, kanser tedavisi ve kök hücre tedavisi gibi biyolojik uygulamalarda gen transferi önemli bir teknolojik ilerleme olarak ortaya çıkmıştır. Gen transferinin oynadığı rollerin tümü önemlidir ve hastalıkların tedavisinde gelişmişlik vaadeden yöntemlerin arasına girebilir. Gen terapisi, arızalı bir proteinin yerini alacak yeni, hedeflenmiş bir gen sunabilir ve sinyal iletim yolunu değiştirerek proteinin işlevini iyileştirebilir. Mevcut araştırmalarda görülüyor ki araştırmacılar, DNA veya RNA'nın hedef hücreye doğrudan implantasyonunun zor olması nedeniyle vektörleri taşıyıcı olarak kullanıyor [55]. Elektro-eğirme yoluyla yapılan nanofiber iskelelerin kanser tedavilerinde kullanıldığı durumlar olduğu kadar bu yöntemi sınırlayan noktalar da vardır. Zayıf transfeksiyon etkinliği ve yanlış nükleik asit

kapsülleme gibi çözülmemiş bazı sorunlara rağmen gen taşınımı nanofiberlerin kullanımı devam etmektedir [44].

1.6. Üretim Yöntemleri

1.6.1. Eklemeli İmalat

Eklemeli üretimin tıpta uygulanması, hasta bakımının kişiselleştirilmesine olanak tanır. Eklemeli imalat hızlı bir şekilde malzeme üretimine olanak sağladığı için tercih edilen bir yöntemdir [56]. Biyomedikal alanda farklı şekillerde kullanılan eklemeli imalat yöntemleri vardır. Malzeme Ekstrüzyonu (Erimiş Biriktirme Modelleme (FDM), Jel veya macun ekstrüzyonu), Vat Polimerizasyonu (Stereolitografi (SLA), Dijital Işık Projeksiyonu (DLP)), Toz Yatağı Füzyon (Seçici Lazer Sinterleme (SLS)), Bağlayıcı Püskürtme (Toz Yataklı Mürekkep Püskürtmeli baskı), Malzeme Püskürtme (Mürekkep Püskürtmeli baskı, Polyjet), Levha Laminasyon (Lamine Nesne İmalatı) gibi üretimler eklemeli imalat yöntemlerinden sayılabilir. Bilgisayar destekli dizayn özelliğine sahip CAD programları ile kişiselleştirilmiş, tekrarlanabilen, karmaşık geometriye sahip, por yapılı üretimler yapılabilir [57]. Bu üretim metodunu sınırlayan şeylerden bir kaçısı por geometrisi, ara bağlantı ve boyutunun her zaman istenildiği gibi kontrol edilememesi olmasına rağmen hastalara özel malzemelerin üretimi için kullanılabilir [58], [59].

Ayrıca geleneksel üretim yöntemleriyle aynı hassasiyette üretilemeyen implant, protez, gözenekli iskele gibi karmaşık geometri ve yapıların inşa edilmesi de mümkün. CAD yazılımı, kişiselleştirmeden vazgeçmeden doğru ve tekrarlanabilir şekilde üretilebilen şekil ve geometrinin tasarlanmasına olanak sağlar [60].

1.6.2. 3 Boyutlu Basım Teknolojisi

X-Y-Z koordinatlarında yapılan 3 boyutlu baskı, bilgisayar destekli tasarımdan karmaşık 3D geometriler oluşturmak için farklı malzemelerin katman katman biriktirildiği bir eklemeli üretim prosesidir [61]. Bilgisayar destekli tasarımların kullanımıyla karmaşık 3 boyutlu geometriler oluşturur [62], [63]. 3D baskının en önemli avantajı, karmaşık mimarilerin endüstriyel ölçekte veya masaüstü baskı ölçeğinde verimlilik ve özelleştirilebilirlikle basılabilmesidir. 3D baskı ürünleri, teknolojik olarak daha fazla

gelişerek ve evrilerek son zamanlarda biyobaskı adı verilen ve canlıların yaşamını sürdürdüğü bir süreç haline geldi [64].

Klasik eklemeli imalatın bir ürünü olan 3D baskı teknolojisi ve biçimi son zamanlarda canlı hücrelerin, hücre dışı matris (HDM) bileşenlerinin, biyomateryallerin ve biyokimyasal faktörlerin genelde sıvı rezervuar üzerine basıldığı, biyobaskı adı verilen bir sürece evrildi [65]. Biyobaskının klasik 3D baskılara göre avantajlar arasında canlı hücreler içeren geometrik olarak kompleks yapı iskeleleri oluşturma yeteneği, verimlilik, ulaşılabilir maliyet, yüksek verim ve hassas tekrarlanabilirlik yer alır [66]–[68]. İstenilen konfigürasyon yapısına sahip birden fazla hücre tipinin basılabildiği 3D basım için biyomürekepler hücre dışı matrisi (HDM) olabildiğince taklit ederek kültüre edilebilen bir malzeme tabanı sağlar [69]–[71]. Bu benzersiz avantajlarla biyobaskı, biyokimyasal yüzey modelleme ve yara iyileşmesi için biyomateryallerin yerinde basılmasının yanı sıra temel araştırma rejeneratif tıp, hastalık modelleme veya farmasötik araştırmalar için 3 boyutlu doku yapılarının tasarlanması da dahil olmak üzere geniş bir uygulama yelpazesi sunar [72].

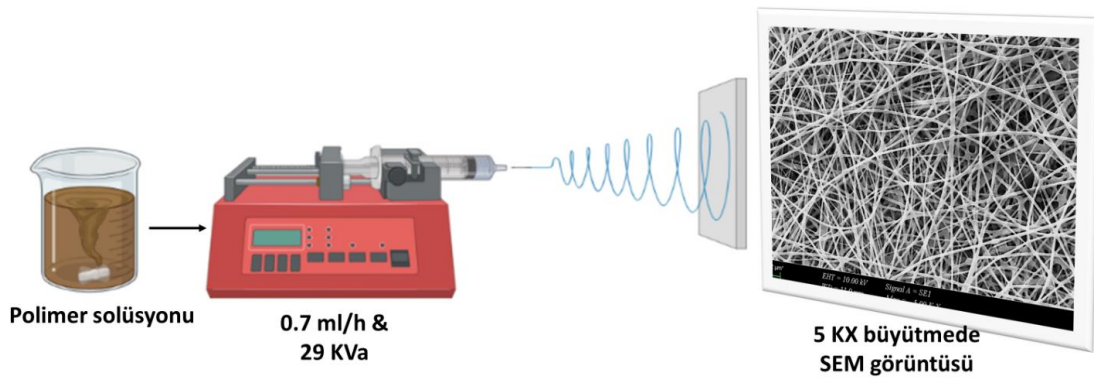
1.6.3. Elektro-eğirme Yöntemi

Nanofiber boyutta fiberler elektro-eğirme yöntemi kullanılarak kolay ve hızlıca üretilir. Bu yöntemin temel çalışma prensibi elektrik kaynağından sağlanan elektrostatik kuvvet ile iğne ucundaki polimer çözeltisi arasındaki elektrofiziksel etkileşimdir [73]. Elektro-eğirme yönteminin ürünü olan nano lifli tabakanın homojen yüzey alanında bulunan gözenekler yaralı doku bölgelerinde hücre bağlanmasını, gaz alışverişini, tutunmaya olan eğilimi ve hücre büyümesini destekler. Nano ölçekli fiber çapları, yüksek gözenekli ve pürüzsüz morfolojileri nedeniyle doku mühendisliği iskeleleri, yara pansumanları ve ilaç dağıtım sistemleri de dahil olmak üzere biyomedikal alanda geniş bir uygulama alanına sahiptir [74]. Bu yöntem ile ultra ince, uzun boyutlu ve dar çapa sahip fiberler seri bir şekilde üretilir.

Elektro-eğirme cihazının kurulumu için polimer solüsyonu tipik bir şırınga aracılığı ile voltaj ve akış hızının kontrol edildiği bir pompaya yerleştirilir. Şırınga içinde bulunan polimer solüsyonun elektrik alana iletimi için sıvı çözelti ince hortumlar aracılığı ile

taşınır ve metal bir iğne ile düzeneğe sabitlenir. Voltaj ve akış hızının kontrol edildiği pompadan yüksek bir voltaj (5-30 kV aralığında) çıkışı yapıldığında hortumlardan iğneye optimum akış hızında ilerleyen sıvı damlacık üzerinde yüzey yük yoğunluğunun yükselmesi sonucu damlacık koni formunu alır. Bu koni formu literatürde Taylor konisi olarak isimlendirilmiştir. Taylor konisi formundaki sıvı damlacık elektrik yüklenmiş bir polimer sıvısı olarak topraklanmış metal silindir toplayıcıya doğru hareket eder. Bu şekilde başlayan elektro-eğirme prosesi jet başlatma yapmış olur. Jet başlatmada, jet düz bir yörünge izler. Bu yörünge içinde jet spiralleşerek bükülme kararsızlığı yaşar. Bükülme kararsızlığı durumu jet çapının farkedilir ölçüde mikron hatta mikron altı seviyelere düşmesi olarak sonuçlanır. Çözücü bu esnada buharlaştığı için fiber yapıda katılaşma meydana gelir. Katılaştıran fiberler lif formunda topraklanmış metal silindir etrafında birikim gösterir ve zamana bağlı olarak ağsı bir yapı gösterir [75].

Elektro-eğirme tekniğinin çok sayıda avantajı arasında basitliği, kolay kurulumu, ulaşılabilir maliyet, polimer çözeltilisine yüksek ilaç yükleme kapasitesi ve çeşitli polimerik fiberleri eğmeye uyulanabilirliği yer alır [76], [77]. Elektrosipin nanofiber yamaların ilaç salınım profili hedef bölgeye kolayca ayarlanabildiğinden ve ilaç dağıtım profili fiber bileşimi, gözeneklilik ve morfolojinin modülasyonu ile kontrol edilebildiğinden, elektrosipin nanofiber yamalar aynı zamanda anti-kanser ilaçlarını taşımak için de kullanıma elverişlidir [78].

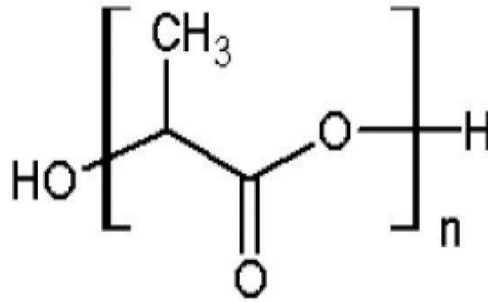


Şekil 1.8 elektro-eğirme prosesi

1.7. Polimerler

1.7.1. Polilaktik asit

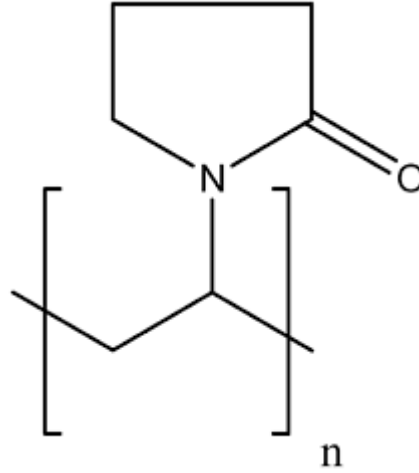
PLA dokuyula yüksek biyoyumluluk, yüksek mekanik mukavemet, alım gücü karşılanabilir, çevre dostu olma ve ilaç dağıtım sistemleriyle uyumluluk gibi elektro-eğirme teknolojisi araştırmalarındaki avantajlarından dolayı sıkça tercih edilen bir polimerdir [79]. PLA biyolojik olarak parçalanabilitesi yüksek bir yapay malzeme olduğu için çeşitli doku mühendisliği uygulamaları için elverişlidir bir bazdır [80]. PLA bazı nano lifli yamaların, başlangıçtaki patlamayı ortadan kaldırarak aktif bileşenlerin istenen salınma kinetiğininde profil gösterdiği keşfedilmiştir [81]. PLA vücudun karbonhidrat metabolizmasında monomerik laktik asit birimine indirgenebilmesi özelliği sayesinde ilaç dağıtım sistemlerine uygulanabilir [82]. PLA'nın bilinen ideal özelliklerinin yanı sıra, PLA nanofiberleri, kanser ilaçların kapsüllenmesi için karmaşık 3 boyutlu mikroskobik ve nano ölçekli yapıların oluşturulmasına elverişlilik sunar [83].



Şekil 1.9 PLA polimerinin kimyasal yapısı [84]

1.7.2 Polivinil prolidon

PVP, temel bir sentetik malzeme olarak kullanılabilir. Toksik değildir ve biyolojik olarak uyumludur [85]. PVP yüksek hidrofilikliğe, termal stabiliteye, gerilme mukavemetine, çözünürlüğe, bükülebilirliğe ve film oluşturucu özelliklere sahiptir. Bu nedenle PVP, tıbbi uygulamalarda umut verici bir biyomühendislik malzemesi olarak düşünülebilir [86]. PVP kanser ilaç taşınımında amorf yapısı ve süspansiyon, emülsiyon stabilizasyon özelliklerinden dolayı inert farmasötikler için uygun bir polimerdir [87].

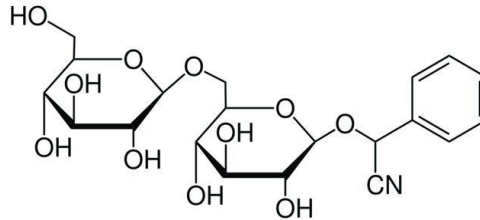


Şekil 1.10 PVP polimerinin yapısı [88]

1.8.Etken Maddeler

1.8.1. Amigdalın

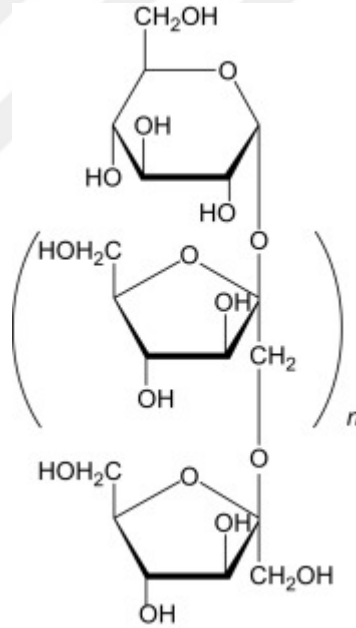
AMG, içerisinde bulunan doğal madde (D-mandelonitril-b-D-glukozit-6-b-glikozit) siyanojenik glikozit ailesine ait olup antikanser ajan olarak literatürde geçer. Bu antikanser ajan kayısı, kiraz, badem, şeftali gibi meyvelerin çekirdeklerinden elde edilen kimyasal bir bileşiktir [19][89]. Antitümör özelliklere sahip bir madde olan AMG bununla beraber antitümör özelliklerine ek olarak antioksidan, antibakteriyel ve antiinflamatuvar özelliklere de sahiptir. Ağızdan alındığında toksik olmayan amigdalın aynı zamanda immünomodülatör bir maddedir [90]. AMG'nin ayrıca insan kolon kanseri hücrelerinde hücre döngüsüyle ilişkili genlerin ekspresyonunu azalttığı da bulunmuştur [91].



Şekil 1.11 AMG ilacının kimyasal yapısı [92]

1.8.2. *Inula helenium* (I.H)

Bitki kökenli ilaçlar, düşük toksisiteye ve yüksek etkinliğe sahip olmaları nedeniyle fitotıp tarihinde kanser tedavilerinde vazgeçilmez bir yere sahiptir [93]. Birçok doğal etken maddeyi içeren şifalı bitkiler, potansiyel antikanser ajanları olarak bilinmektedir. Özellikle son yapılan araştırmalara göre doğal fitokimyasal bileşenlere sahip ürünlerin, anti-kanser özelliklerinden dolayı alternatif bir kanser tedavi yöntemi olduğu ortaya çıkmıştır [94]. Latince literatürde "Elecampane" olarak da bilinen bir seskiterpen lakton olan alantolakton olan andız, Çin bitkisel ilacı *Inula helenium*'un (I.H) aktif bir bileşenidir [95]. Bu bitkide bol miktarda bulunan seskiterpen laktonların, özellikle alantolakton ve izoalantolaktonun antikanser özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu özellikler arasında ilaç direncinin, metastazın önlenmesi ve apoptozun uyarılması yer alır [96].



Şekil 1.12 I.H bitkisinin kimyasal yapısı [97]

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1.Malzemeler

Deneyleerde kullanılan malzemeler polilaktik asit (PLA), polivinilprolidon (PVP), Amigdalin (AMG), *Inula helenium* bitki ekstraktıdır (*I.H*) . Yardımcı solüsyonlar kloroform, etanol, dimetilsülfoksit (DMSO) ve Tween 80 yüzey ajanı.

2.1.1. PLA

PLA (moleküler ağırlık (Mw) = 420,000 g/mol) 2003D, Nature Works LLC, Minnetonka, MN'den satın alınmıştır. Suda çözünmeyen hidrofobik bir polimerdir.

2.1.2. PVP

PVP moleküler ağırlığı 40.000 g/mol olup, Sigma-Aldrich'den (USA) satın alınmıştır. PVP suda çözünebilir bir polimerdir.

2.1.3. AMG

Farmasötik bileşen olan ticari AMG, Sigma Aldrich'ten (USA) satın alınmıştır. AMG kansızlık, astım bronşit, ateroskleroz (damar sertleşmesi), diyabet ve kanser tedavilerinde kullanılmaktadır.

2.1.4. *I.H*

I.H Bitki Ekstraktı Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim dalı Laboratuvarından temin edilmiştir.

2.1.5. Kloroform

Kloroform Sigma Aldrich (USA) firmasından temin edilmiştir.

2.1.6. Etanol

Etanol Isolab firmasından temin edilmiştir.

2.1.7. DMSO

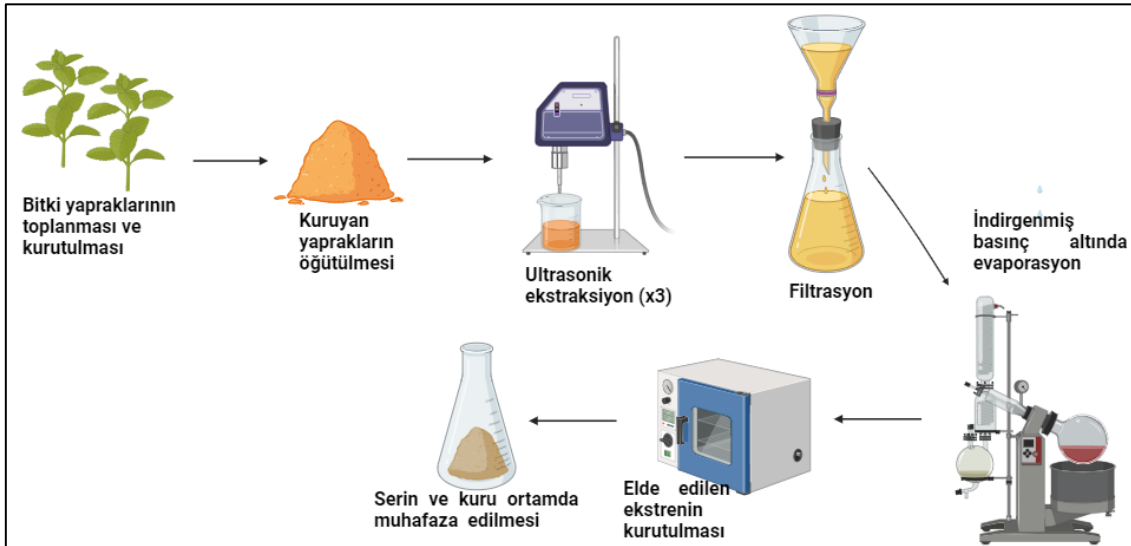
DMSO Sigma Aldrich (USA) firmasından temin edilmiştir. Polar bir çözücüdür. dimetilformamid, dimetilasetamid, *N*-metil-2-pirrolidon gibi türevlerinden daha az toksik reaksiyon gösterir.

2.1.8. Tween 80

Tween 80 Sigma Aldrich (USA) firmasından alınmıştır. Tween 80 polisorbat naniyonik yüzey aktif ajanı olarak kullanılır ve solüsyonu stabilize etmeye yardımcı olur.

2.2. *I.H* Bitki Ekstraktının Elde Edilmesi

I.H bitkisinin yaprak kısımları toplandı. Toplanan yapraklar ilk önce serin ve kuru bir ortamda kurutuldu. Kuruyan yapraklar ince bir toz haline gelinceye kadar bir karıştırıcıda öğütüldü. Daha sonra toz haline getirilmiş 2 g *I.H*, %70 etanol içeren ultrasonik ekstraksiyon cihazında 60 °C'de 1 saat süreyle ve ardı ardına 3 ekstraksiyonla ekstrakte edildi. Ekstrakt ilk önce Whatman mavi bant filtre kağıdından süzüldü ve daha sonra nem kuruyuncaya kadar 50 °C'deki evaporatörde indirgenmiş basınç altında buharlaştırıldı (Şekil 2.1.). Kurutulduktan sonra elde edilen kalıntı ham bitki ekstraktı olarak tartıldı ve şişelere aktarıldı. Uygun saklama koşullarında +4 C'de ve karanlık ortamda ağzı sıkıca kapatılarak muhafaza edildi. Ham ekstrakt, nano lifli yama üretiminde kullanılmak üzere DMSO içerisinde çözüldü.



Şekil 2.1. Andız bitki ekstraksiyon prosesi

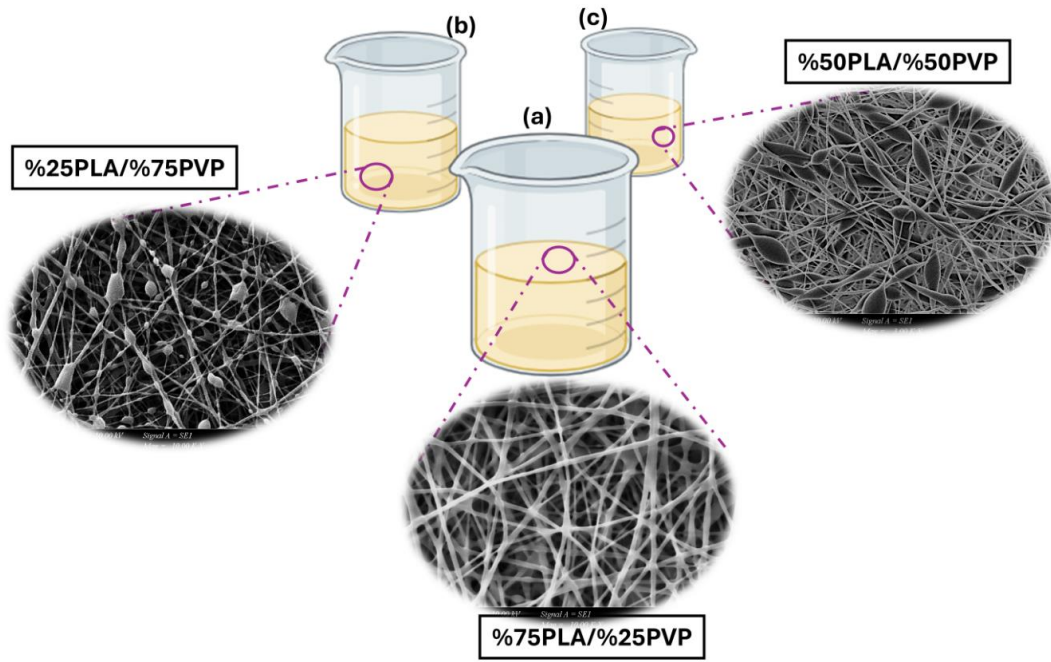
2.3. Çözeltilerin Hazırlanması

2.3.1 Polimer Çözeltilerinin Kombinasyonu ve Optimizasyonu

PLA ve PVP polimerlerinden oluşan solüsyonun kombinasyonu için 3 farklı oranda karışım yapıldı. Sırasıyla PLA ve PVP polimeriyle hazırlanan karışımlar bu iki solüsyon grubu için 75:25, 50:50, 25:75 şeklinde denendi.

PLA/PVP için, 75:25 oranında hazırlanan solüsyon grubuna 10 ml kloroforma %8 PLA eklenerek çözündürüldü. Çözünen solüsyonun içerisinde %1 oranında Tween 80 eklenerek karıştırıldı. 7,5 ml alınarak üzerine 10 ml etanol ve %1 PVP karışımından alınan 2,5 ml eklendi. 50:50 oranında hazırlanan solüsyon grubu için 10 ml kloroform içerisinde çözünen %8 PLA karışımından 5 ml alınarak üzerine 10 ml etanol içerisinde çözünen %1 PVP karışımından alınan 5 ml eklendi. 25:75 oranında hazırlanan solüsyon grubu için 10 ml kloroform ve %8 PLA karışımından 2,5 ml alınarak üzerine 10 ml etanol içerisinde çözünen %1 PVP karışımından 7,5 ml eklendi (Tablo 1.).

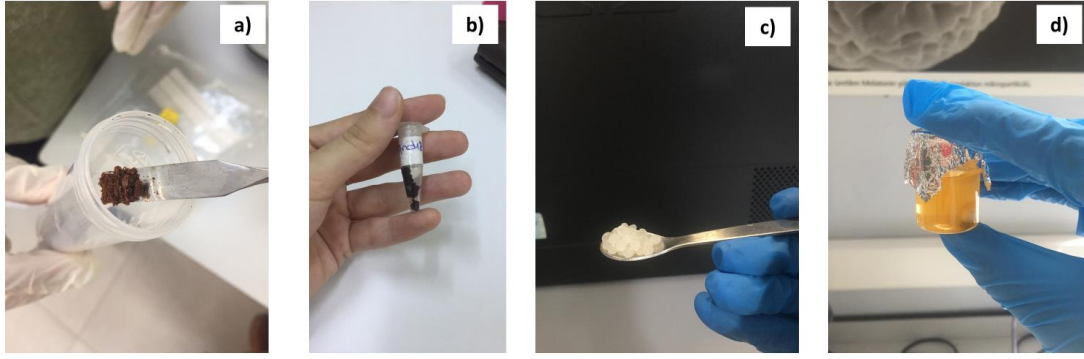
Solüsyonlar hazırlandıktan sonra elektro-egirme yöntemiyle nanofiber üretimi için üç farklı oranda hazırlanan nanofiber gruplarının hepsi 29 kVa voltaj değerinde ve 0.7 ml/s akış hızında 12 cm mesafede elektro-egirme yöntemiyle üretildi. PLA/PVP 25:75, 50:50 ve 75:25 oranda 29 kVa ve 0.7 ml/s akış hızında atılan fiberlerin görüntüleri birbirleriyle karşılaştırıldı. (Şekil 2.4.). Bu denemeler sonucunda en iyi fiberleşen, gözenekli, yumuşak ve pürüzsüz morfolojininin 75PLA/25PVP grubu SEM sonuçları ile desteklendi. İlaç ve bitki ekstraktı bu gruba yüklendi.



Şekil 2.2. Üç farklı karışım oranında denen PLA/PVP fiberleri. (a) 75:25 oranı, (b) 25:75 oranı, (c) 50:50 oranı

2.3.2 PLA/PVP/*I.H* Çözeltisinin Hazırlanışı

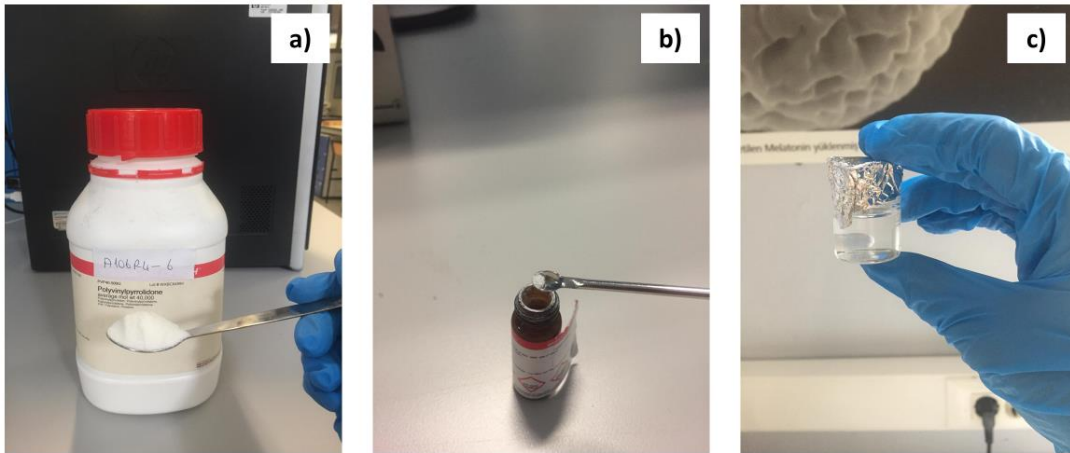
I.H içeren çözeltiyi hazırlamak için 9 ml kloroform içerisinde %8 PLA, 500 rpm'de ısıtılmadan 1 saat karıştırıldı. Daha sonra PLA çözeltisine ağırlıkça %1 Tween 80 damla damla ilave edildi ve çözelti 350 rpm'de 35 dakika daha karıştırıldı (Şekil 2.2.). Ayrı bir beher içerisinde 1 ml DMSO çözücüsüne toz halindeki ekstre edilmiş 40 mg *I.H* ilave edildi ve ısı olmadan 350 rpm'de 5 saat karıştırıldı. 5 saatin sonunda bitki ekstraktı içeren beherde solüsyon renginin açık sarı bir renge dönüştüğü gözlemlendi. Hazırlanan 9 ml kloroform içerisinde hazırlanan 1 ml *I.H* eklenerek 1 saat karıştırıldı. Bu solüsyondan 7.5 ml alınarak ayrı yerde hazırlanan 2.5 ml miktarında %1 PVP ile 30 dk karıştırıldı.



Şekil 2.3. *I.H* çözeltisinin hazırlanışı. a) bitki ekstraktının kurutma işleminden önceki formu, b) bitki ekstraktının kurutma işleminden sonraki formu, c) PLA polimeri d) *I.H* içeren PLA solüsyonu

2.3.3 PLA/PVP/AMG Çözeltisinin Hazırlanışı

AMG çözeltisi için %1 PVP tartıldı ve 10 ml etanol ile ayrı bir beherde ısıtılmadan 2 saat boyunca 550 rpm’de karıştırıldı. Çözeltiye 40 mg ticari AMG ilacı ilave edildi. AMG ilacı PVP ve etanol içerisinde tamamen çözünmesi için 230 rpm’de 30 dakika karıştırıldı. 30 dakikanın sonunda şeffaf bir solüsyon elde edildiği gözlemlendi (Şekil 2.3.). Bu solüsyondan da 2.5 ml alınarak ayrı yerde hazırlanan PLA çözeltisinden 7.5 ml alınarak birlikte 30 dk karıştırıldı.



Şekil 2.4. AMG çözeltisinin hazırlanışı. a) PVP, b) ticari AMG ilacı, c) AMG içeren PVP solüsyonu

Tablo 1. Solüsyon bileşenleri ve oranları

	PLA	PVP	Tween 80	I.H	AMG
75PLA/25PVP	8 %	1 %	1 %	0	0
75PLA/25PVP/I.H	8 %	1 %	1 %	0.4 %	0
75PLA/25PVP/AMG	8 %	1 %	1 %	0	0.4 %
75PLA/25PVP/I.H/AMG	8 %	1 %	1 %	0.4 %	0.4 %
(K)					
75PLA/25PVP/I.H/AMG	8 %	1 %	1 %	0.4 %	0.4 %
(ÇK)					

2.4 Elektro-eğirme Yöntemiyle Nanofiber Üretimi

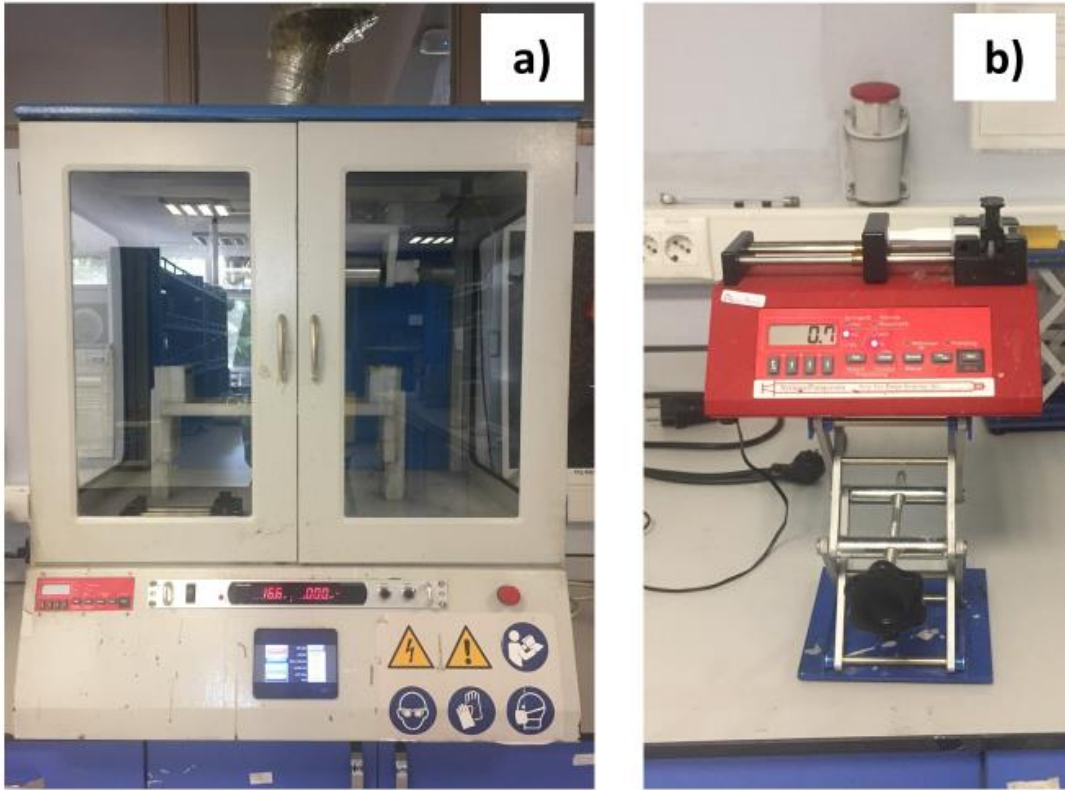
Elektro-eğirme için laboratuvar tipi bir cihaz (NS24, Inovenso Co., Türkiye) kullanıldı. Hazırlanan solüsyonlar enjektöre aktarıldı. Enjektör, akış hızının ayarlandığı bir pompaya bağlandı. Pompanın içindeki enjektör elektro-eğirme makinesinin iğnesine polietilen plastik kablo yardımıyla bağlandı. İğne ile toplama metal silindiri arasındaki mesafe 12 cm'dir. Toplayıcı metal silindirin etrafına parşömen kağıdına sarıldı. Optimize edilen tüm çözeltiler 0,7 ml/saat ve 29 kVa'da uygulandı.

Üretim sonucunda toplam 5 farklı model de nanaofiber grup elde edildi. Elde edilen bu gruplarda *I.H* ve AMG aktivitelerini görmek için önce ayrı şekillerde yüklendi. Böylelikle bitki ekstraktı ve ticari ilacın tek başına fibere yüklendiğinde performansı görülmüş ve değerlendirilmiş oldu.

Bitki ekstraktı ve ticari ilacın birbiriyle olan etkileşimi için bu iki etken madde karıştırılarak tekrar elektro-eğirme yöntemiyle fiber atımı gerçekleştirildi. Böylelikle iki etken madde karışım (K) halinde fiber olarak atıldı ve bir aradaki etkileşimleri incelendi.

Bir diğer model için ise bitki ekstraktı ve ticari ilaç katmanlı bir tasarım yapıldı ve fiber yapı oluşturuldu. Katmanlı yapı için önce *I.H* bitki ekstraktı içeren fiber optimize edilen akış hızı ve kV değerinde elektro-eğirme yöntemiyle atıldıktan sonra üzerine ayrıca hazırlanmış olan ticari ilaç AMG içeren solüsyon tekrar ikinci bir kat olarak atıldı. Böylelikle çift katmanlı (ÇK) nanofiber yapı elde edilerek sonuçlar değerlendirildi ve

karşılaştırıldı. Üretilen nanofiber gruplarında PLA ve PVP içeren grup 75PLA/25PVP olarak isimlendirildi. Solüsyona sadece *I.H* bitki ekstraktı yüklenen nanofiber grubu 75PLA/25PVP/*I.H* olarak isimlendirildi. Solüsyona sadece AMG ticari ilacı yüklenen nanofiber grubu 75PLA/25PVP/AMG olarak isimlendirildi. Solüsyona iki etken malzemenin bir arada bulunduğu ve beraber karıştırıldığı nanofiber grubu 75PLA/25PVP/*I.H*/AMG (K) olarak ifade edildi. İki ayrı bileşenin iki ayrı katman halinde hazırlandığı nanofiber grubu ise 75PLA/25PVP/*I.H*/AMG (ÇK) olarak gösterildi.



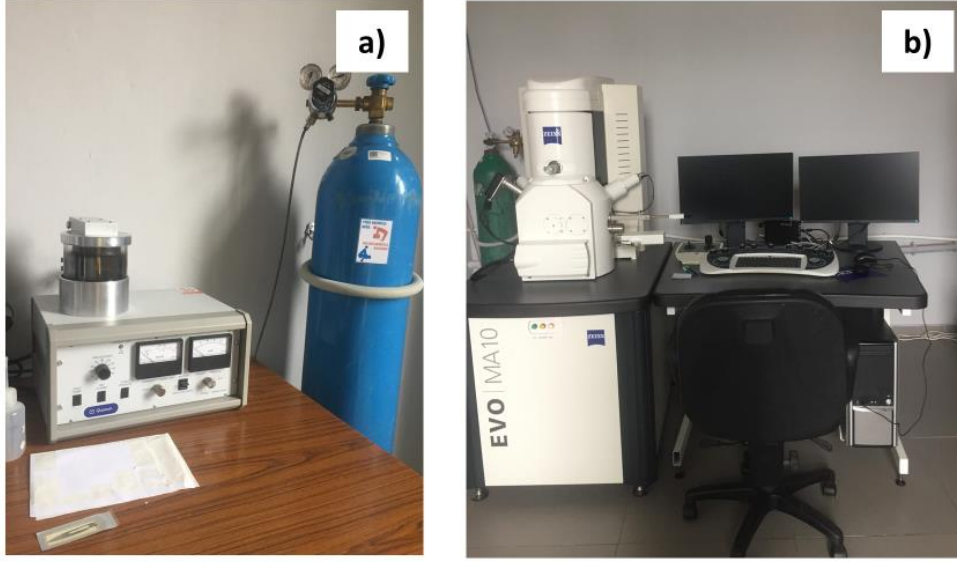
Şekil.2.5. a) Elektrospın cihazı, b) pompa ve şırınga

2.5. Üretilen Nanofiberlerin Karakterizasyonu

2.5.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

75PLA/25PVP, *I.H* ve AMG yüklü nanofiberli yamalardan oluşan 5 grubun morfolojilerini görüntülemek için SEM (EVO LS 10, ZEISS) cihazı kullanıldı. Numuneler kesildi ve yüzeyleri Quorum SC762 Mini Sputter Coater ile 120 saniye

boyunca altın-paladyum kaplamayla kaplandı. Elde edilen SEM görüntülerinde nanofiberli yama üzerinden her grup için nm ayarı yapılarak 100 adet çap ölçümü alındı. (Olympus AnalysisSIS, ABD).(Şekil 2.6.) Ölçülen nanofiberlerin çap dataları SPSS programıyla histogram grafikleri çizilerek ortalama çap boyut bilgisi elde edildi.



Şekil 2.6. a) Kaplama cihazı ve b) Taramalı elektron mikroskobu

2.5.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

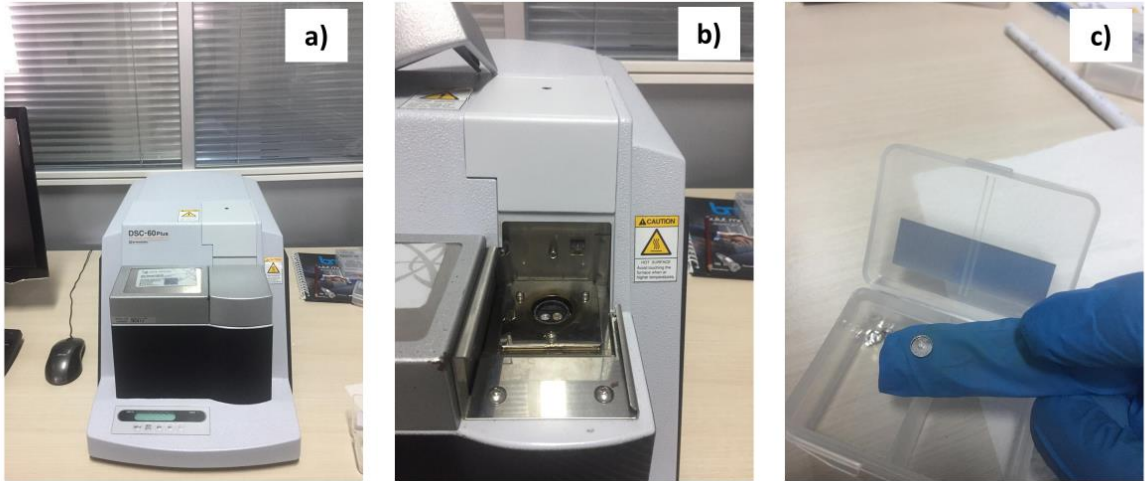
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), fourier matematiksel dönüşümü ile ışığın kızılötesi yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen kimyasal analitik yöntemdir. IR ışınları madde içerisinden geçerken molekülerin veya atomların bağlarının eğilmesi, gerilmesi, vibrasyonu veya spin sonucu oluşan absorpsiyon ile spektrum oluşur. Bağlar hakkında yorum yapabilmek için oluşan spektrumlar incelenir. Nano lifli yamaların fonksiyonel gruplarındaki bağ yapılarını analiz etmek için FTIR cihazı (Şekil 2.7.) (Jasco FT/IR-4700) kullanıldı. Bu analiz için tüm spektrumlar 4000 cm^{-1} ile 400 cm^{-1} tarama aralığında, 32 tarama hızında ve 4 cm^{-1} çözünürlükte analiz edildi ve değerlendirildi.



Şekil 2.7. FTIR cihazı

2.5.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi (DSC)

Malzemenin termal davranışını ve ısıya karşı verdiği reaksiyonları incelemek için diferansiyel taramalı kalorimetre cihazı kullanıldı. Camı geçiş sıcaklığı (T_g) ve erime sıcaklığı (T_m) gibi ana termal geçişleri ve ısıtma hareketlerini belirlemek için diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) cihazı (Shimadzu, Japonya) ölçüldü (Şekil 2.8.). Nano lifli yama için $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ila $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında, $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$ ısıtma hızında ayarlama yapıldı.



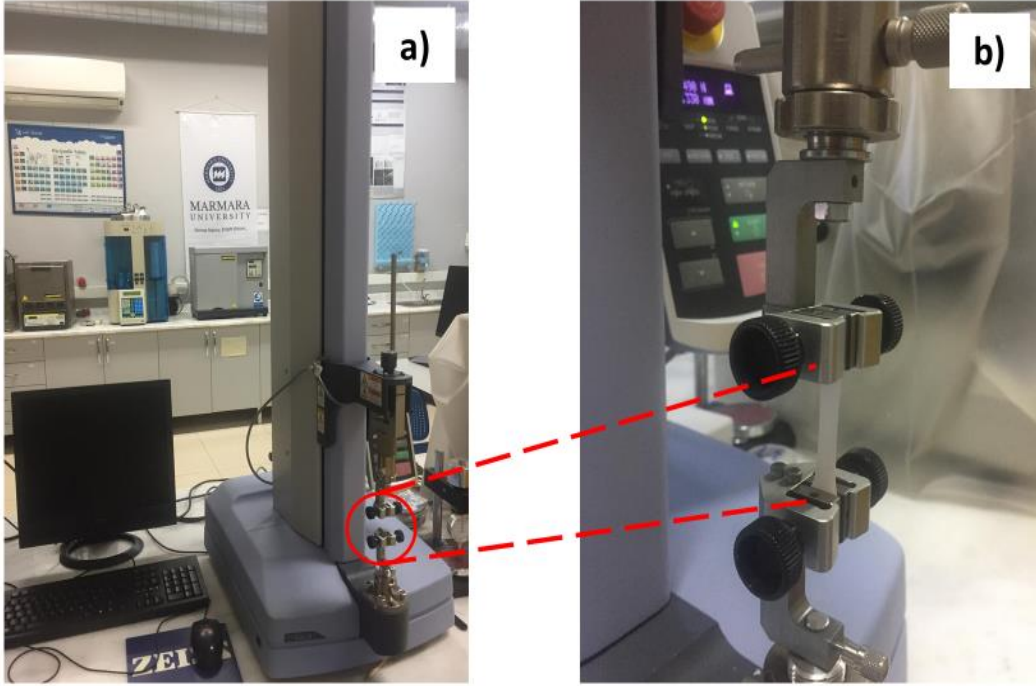
Şekil 2.8. a) DSC cihazı, b) numunelerin cihazda yerleştirildiği kısım, c) numunelerin içine konduğu alüminyum yuva

2.5.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)

Fenolik maddelerin belirlenmesinde HPLC yöntemi (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) kullanıldı. Fenolik bileşikler 278 nm dalga boyunda ve 0,8 mL/dakika akış hızında tespit edildi. Agilent Eclipse XDB C-18 (250x4,6 mm) 5 µm ters faz kolonu kullanıldı ve kolon sıcaklığı 30 °C olarak ayarlandı. Ayırma, ikili çözücü sistemle gradyan programı uygulanarak yapıldı. Çözelti A %3 asetik asit; çözelti B metanol olarak kullanıldı. Çalışmada kullanılan HPLC cihazı Shimadzu (Kyoto, Japonya) marka olup içerisinde Shimadzu marka dedektör (SPD-M10A vp Photo Diode Array dedektör), kolon fırını (CTO-10A vp), pompa (LC-10AD vp), degazör (DGU-14A).) ve otomatik enjeksiyon (SIL-10AD vp) sistemi bulunmaktadır. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yönteminde kullanılan kolon, sıvı kromatografisinin önemli bir bileşenidir ve analitik ayırmanın kalitesi ve hassasiyeti üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Sütun seçimi analitlerin özelliklerine, analizin amacına ve diğer deney koşullarına dayanmaktadır. Bu çalışmada tercih ettiğimiz kolon tipi 250x4,6 mm boyutlarında sıvı kromatografi kolonu olan Agilent Eclipse XDB C-18'dir. Kolonun uzunluğu 250 mm ve iç çapı 4,6 mm'dir. Kromatografik çözünürlüğü etkileyen çok önemli bir faktör olan 5 µm parçacık boyutuna sahiptir. C-18 tanımı kolonun kimyasal yüzeyini tanımlar. Bu sütun tipik olarak hidrofobik etkileşimlere dayalı olarak analitleri ayırmak için kullanılır. C-18, 18 karbon zinciri uzunluğuna sahip bir alkil ligandını belirtir.

2.5.5. Mekanik Analiz

Nanofiberli yamanın mekanik mukavemetini, elastik modülüsünü, sünekliği, gerilim kuvveti altındaki tepkisi ve kopma gerilimini ölçmek için çekme test makinesi (Shimadzu Corporation, EZ-LX, Kyoto, Japonya) kullanıldı. Testten önce nanofiberli yamalar 10x50 mm boyutunda kesildi. Kesilen her numune, dijital bir mikrometre (Mitutoyo MTI Corp., ABD) (Şekil 2.9.) yardımıyla 3 farklı noktadan kalınlık ölçümüne tabi tutuldu. Teste başlamadan önce ortalama kalınlık değerleri isim bilgileriyle birlikte bilgisayar programına (Trapezium) kaydedildi ve çekme testi başlatıldı. Tutarlılık sağlamak amacıyla bu test her grup için üç kez tekrarlandı. Test sonucu ölçümü yapılan verilerin grafiği çizildi.



Şekil 2.9. a) Mekanik analiz için çekme-basma cihazı, b) çekme testinin yapıldığı parça

2.5.6. Şişme-Bozunma Testi

Nanofiberli yama örneklerinin, su tutuculuğunu ve zaman içindeki kütle değişimini belirlemek için tüm gruplara şişme ve bozunma testi yapıldı. Şişme testi için, pH değeri 7,4 olan fosfat tamponlu salin (PBS) kullanılarak her gruptan 1 ml'lik tüplerde 3mg olacak şekilde eşit ağırlıkta üç nanofiberli yama parçası hazırlandı. Eppendorf tüplerinde bir araya gelen 1 ml PBS ve fiber fragmanları termal çalkalayıcıda (BIOSAN TS-100) 37 °C'de 24 saat bekletildi (Şekil 2.10.) ve 24 saatin sonunda örnekler PBS sıvısından çıkarılarak (Ww) elektronik terazide tartıldı. Bu işlem şişme testi süreci boyunca her gün aynı şekilde tekrar edildi ve her gün aynı saatlerde ölçüm üç tekrarlı bir şekilde yapılarak Denklem (1)'e göre grafik haline dönüştürüldü [98].

$$SD = \frac{W_w - W_0}{W_0} \cdot 100 \quad \text{Denklem (1)}$$

Nanofiberli yamalar her grup için 3 mg olacak şekilde eşit ağırlıkta kesildi ve bozunma testinde kullanılmak üzere için tartıldı. Tartımı yapılan nanofiberli yamalar, 1 ml PBS içeren Eppendorf termal çalkalayıcıda 37 °C de 24 saat bekletildi. 24 saat sonra fiberler ve PBS birbirinden ayrıldı. Nanofiber yama, boş Eppendorf tüpünün içine yerleştirildi ve

Eppendorf tüpleri, kapakları açık olacak şekilde 24 saat boyunca 37 °C termal ısıtıcıda kurutuldu. 24 saat sonra kurutulmuş lif numunesi ağırlıkları (Wt) elektronik terazide ölçüldü. Bu işlem bozunma testi boyunca gün aşırı tekrar edildi. Elde edilen sonuçlar Denklem (2)'ye göre grafiğe dönüştürüldü [99].

$$D = \frac{W_0 - W_t}{W_0} \cdot 100$$

Denklem (2)

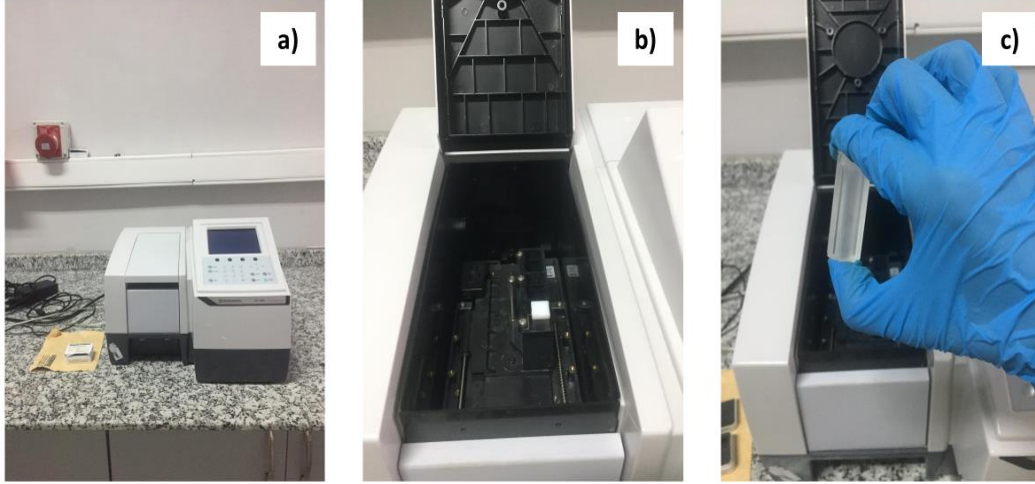


Şekil 2.10. Termal çalkalayıcı

2.5.7. *In-vitro* İlaç Salım Testi

IH ve AMG yüklü nanofiberli yamanın *in-vitro* ilaç salımı için her gruptan 5 mg nanofiberli yama kesilerek 1 ml PBS içeren Eppendorf tüplerine aktarıldı. 15 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 3 saat, 4 saat, 6 saat, 8 saat, 12 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat ölçümleri UV spektrofotometre (Shimadzu UV-3600, Kyoto, Japonya) (Şekil 2.11.) cihazında 190 nm ile 550 nm dalga boyları aralığında ölçüldü. Eppendorf'taki PBS (pH

7,4), her saat ölçümü için yenilendi. Alınan sonuçlara göre absorbans eğrileri ve kümülatif salım grafikleri çıkarıldı. Ölçümler her bir grupta bulunan numuneler için üçer defa tekrarlandı.



Şekil 2.11. a) UV spektrofotometre cihazı, b) salım numunesinin cihazda yerleştirildiği yuva, c) salım numunesinin transfer edildiği kristal küvet

2.5.8. *İn-vitro* Sitotoksosite Analizi

Malzeme sterilizasyonu Sınıf II Laminer akış kabini kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 2.12 (a)). Sterilizasyon için malzemeler 90 dakika boyunca UV ışığı altında tutuldu. İskele mikro ortamının optimizasyonu için, iskeleler 20 mikrolitre büyüme ortamında (%10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM) 1 saat süreyle 37°C'de nemli %5 CO² inkübatöründe 96 kuyucuklu bir plakada inkübe edildi. 5x10³ HCT-116 hücresi, standart hücre tohumlama prosedüründeki gibi 96 kuyucuklu plakalardaki nanofiberli fiberlerin üzerine ekildi. Hücre ekili nanofiberli fiber yapıları ve tek katmanlı kültürler, nemlendirilmiş inkübatörde (NuAire) 37 0C, %5 CO₂'de 1, 3 ve 7 gün süreyle inkübe edildi. Nanofiberli yamalardaki hücre canlılığını analiz etmek için 1,3 ve 7 günlük inkübasyon periyotlarında MTT (3-(4,5-dimetiltiyazolil-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) (Glentham Life Sciences) yöntemi ile test yapıldı. Üretici firmanın protokolüne göre 5 mg/mL MTT solüsyonu eklendi ve %5 CO₂ ile 37 0C'de 5 saat inkübe edildi. Daha sonra 0,1 mL dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edildi. Hücre canlılığını gözlemlemek için plakalar yeniden inkübe edildi (37 0C'de ve %5 CO₂'de 15 dakika). Absorbans, 560

nm dalga boyunda bir mikrolaka okuyucu (BioTech, Epoch) kullanılarak ölçüldü (Şekil 2.12. (b))



Şekil 2.12. Hücre canlılık testi a) steril kabin, b) mikrolaka okuyucu cihaz

2.5.8.1 DAPI Boyama Testi

Kolon kanseri hücrelerinin AMG ve *I.H* yüklü nanofiberli yamalara yapışmasını gözlemlemek ve hücre canlılığını belirleyebilmek için DAPI boyama yöntemi uygulandı. 10^5 hücre/mL yoğunluktaki kolon kanseri hücreleri, 96 kuyucuklu plakadaki her bir sterilize edilmiş nanofiberli yamaya ekildi ve 1, 3 ve 7 gün boyunca %5 CO altında 37 °C'de DMEM içeren bir ortamda kültürlendi. İnkübasyonun sonunda örnekler %4'lük Formaldehit ile 20 dakika süreyle fikse edildi. Daha sonra %0,1 TritonX solüsyonu ile 15 dakika geçirgenleştirildi ve PBS ile yıkandı. Hücre çekirdekleri karanlıkta 5 dakika boyunca 1 µg/ml DAPI solüsyonuyla boyandı. Nano lifli yamalar daha sonra fazla DAPI'yi uzaklaştırmak için PBS ile üç kez durulandı ve bir floresans (Leica) mikroskobu (Şekil 2.13.) kullanılarak incelendi.



Şekil 2.13. Floresan mikroskobu

2.5.8.2 Hücre Tutunmasının Morfolojik Analizi

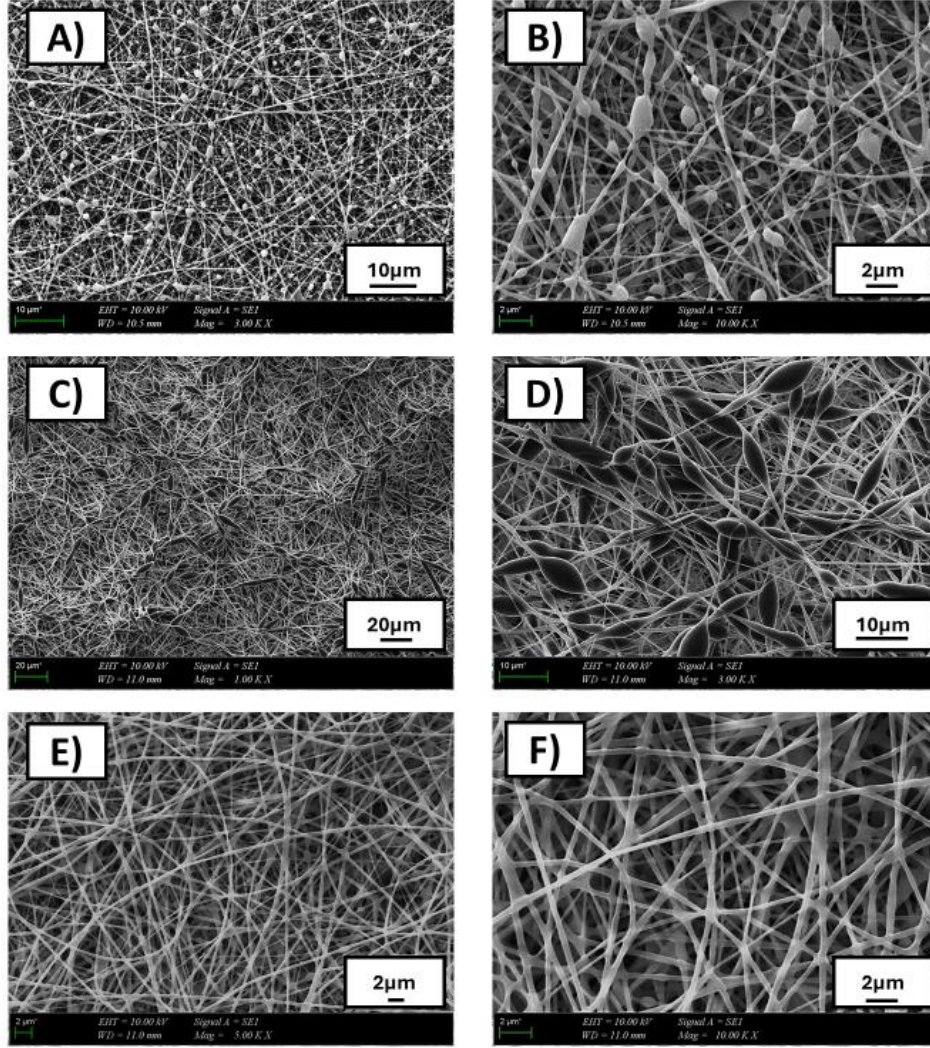
Nanofiberli yama üzerindeki kolon kanseri hücre büyümesi ve yayılma morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) gözlemiyle araştırıldı. AMG ve *I.H* yüklü nanofiberli yamalar iki kez PBS ile yıkandı; bunlar %2,5 glutaraldehid solüsyonunda 24 saat boyunca 4°C'de fiksasyon işlemine tabi tutuldu. Daha sonra fazla glutaraldehit, PBS ile yıkanarak çıkarıldı ve nano lifli yamalar, dereceli bir etanol serisinde dehidre edildi. Numuneler altınla püskürtülerek kaplandı ve SEM (EVO MA-10, Zeiss) kullanılarak morfolojik görüntüleri incelendi.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1.Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Hazırlanan 3 farklı PLA/PVP (75:25, 50:50, 25:75) solüsyon gruplarının elekto-eğirmeyle aynı parametrelerde ve aynı sürelerde yapılan fiber atışlarının SEM sonucu Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre 25PLA/75PVP kombinasyonunda oldukça boncuklu, pürüzsüz olmayan ve fiber morfolojisinden uzak bir görüntü elde edilmiştir (Şekil 3.1. (A) (B)). 50PLA/50PVP kombinasyonu görece fiberleşmeye biraz daha yakın liflerden oluşmasına rağmen Şekil.3.1 (C)(D)'de görüldüğü tam bir fiber formuna ulaşmadan düzensiz kalınlaşan ve tek bir fiber tipinde olmayan ağsı bir yapı oluşturmuştur. 75PLA/25PVP fiber yapısı morfolojik olarak düzgün fiberleşmiş,

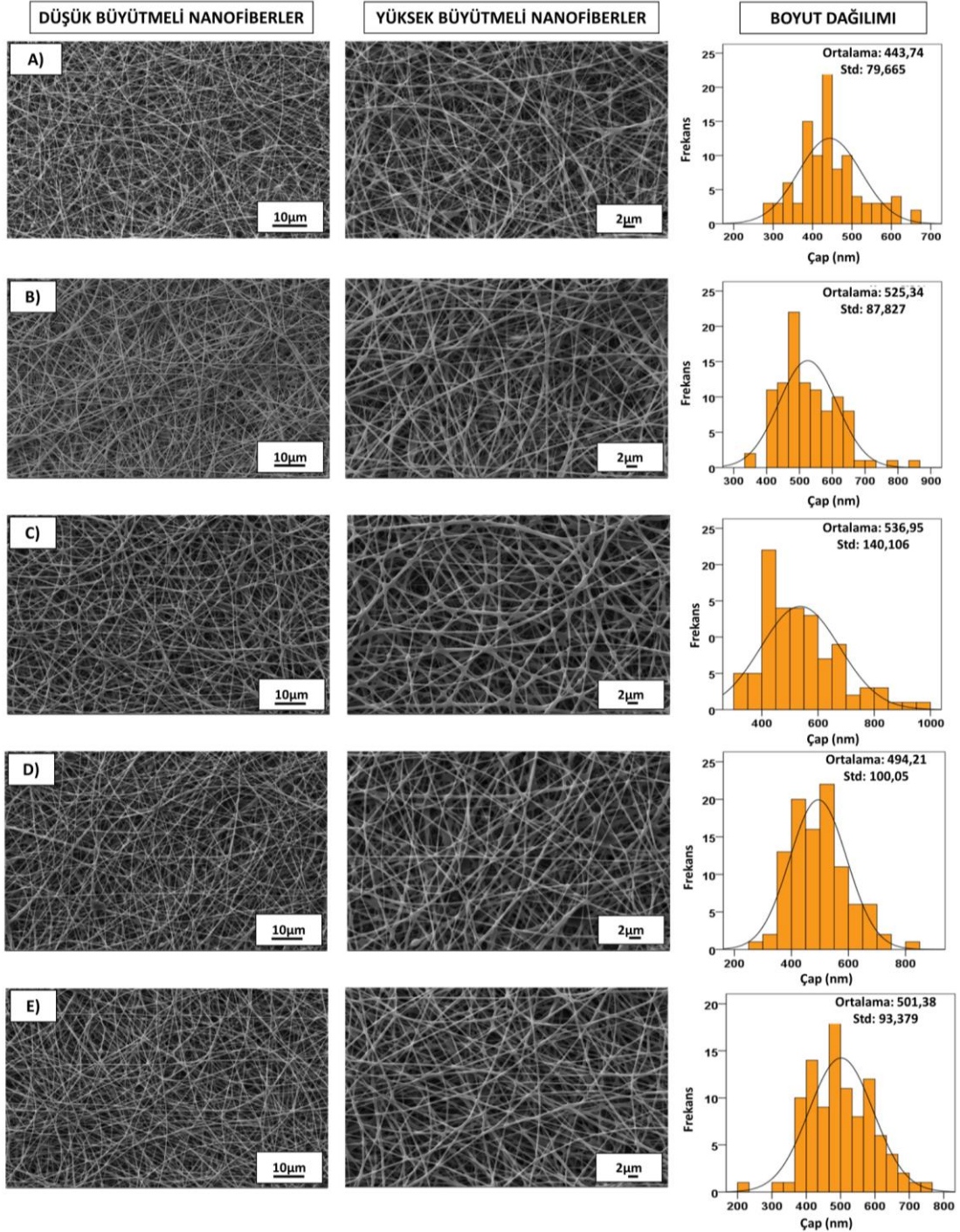
pürüzsüz, boncuksuz, hücre tutunmasına uygun bir yüzey formu ve dağılımı göstererek optimize oran seçilmiştir. Bitki ekstraktı *I.H* ve ticari ilaç AMG belirlenen parametrede optimize edilmiş 75PLA/25PVP kombinasyonuna eklenmiştir.



Şekil 3.1. A) ve B) 25PLA/75PVP, C) ve D) 50PLA/50PVP, E) ve F) 75PLA/25PVP oranlarından elektro-eğirme yöntemi ile üretilen fiber gruplarının morfolojileri için SEM görüntüleri.

Üretilen nanofiberli yamanın çapı ve morfolojik analizi için her gruptan 100'er adet nanofiberin çapı ölçüldü. Bu ölçümlere göre yapılan histogram grafiği Şekil 3.1'de gösterilmektedir. Elde edilen liflerin çapları 75PLA/25 PVP olan saf grup için $443,74 \pm 79$ nm olarak ölçülmüştür. Yalnızca *I.H*'nin 75PLA/25PCP/*I.H* olarak eklendiği grup için

525,34±87 nm olarak ölçüldü. AMG eklenen tek grup 75PLA/25PVP/AMG için 536,95±140 nm sonucu elde edilmiştir.



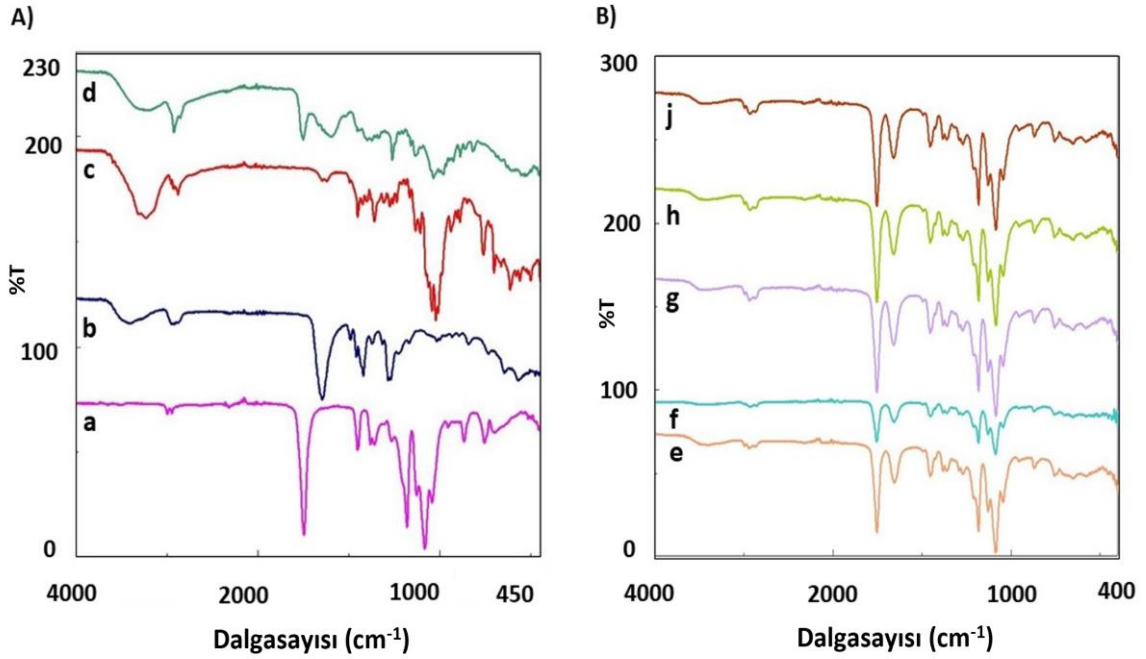
Şekil 3.2. Nanofiberlere ait morfolojik görüntüler ve çap dağılımları. A) 75PLA/25PVP, B) 75PLA/25PVP/I.H, C) 75PLA/25PVP/AMG D) 75PLA/25PVP/I.H/AMG/(K), E) 75PLA/25PVP/I.H/AMG (ÇK)

PLA/PVP, *I.H* ve AMG aktif bileşenlerinin harmanlanıp birbirine eklendiği 75PLA/25PVP/*I.H*/AMG (K) grubu için ölçüm sonuçları Şekil 3.1'de gösterildiği gibi $494,21 \pm 100$ nm olarak ölçülmüştür. 75PLA/25PVP/*I.H*/AMG (ÇK) grubunda *I.H* ve AMG aktif maddeleri ayrı ayrı, karıştırılmadan, çift katman olarak $501,38 \pm 93$ nm'de ölçüldü. Sonuçlara göre 75PLA/25PVP saf grubu en küçük çap ölçüsüne sahiptir. AMG etken maddesinin çap ölçümünü arttırmadaki etkisi *I.H*'ye göre daha yüksektir. Aktif maddelerin ayrı ayrı eklendiği katmanlı grup için lif çapları daha kalın ölçüldü. *I.H* ve AMG karıştırılıp fibere yüklendiğinde, fiber çapı bağımsız yüklemeye kıyasla azaldı. Sridhar ve arkadaşları kanser üzerine yaptıkları çalışmada PLA gibi sentetik bir polimer olan PCL'ye zerdeçal ve aloe vera aktif maddelerini eklediklerinde nanofiber çapında artış gözlemlenildi [100]. Fan ve Daniels tarafından yapılan nanofiberli yara pansuman çalışmasında huş ağacı bitkisinden elde edilen triterpen ekstraktının PLA'ya yüklenmesiyle elde edilen lif çapları karşılaştırılmıştır. Triterpen ekstraktı ile yüklenen elyafın, triterpen içermeyen elyaftan daha ince bir çapa sahip olduğu görülmektedir. Literatürde bitki ekstraktının çap kalınlığını arttırdığını veya azalttığını ya da herhangi bir değişikliğe neden olmadığını destekleyen çalışmalar mevcuttur [101].

3.2. Fourier Dönüştürülmüş Kızılötesi Spektrum Analizi (FTIR)

FT-IR analizi nano lifli yama gruplarının fonksiyonel gruplarının yanı sıra bileşenler arasındaki etkileşimleri araştırmak için kullanılan bir spektroskopi tekniğidir. Saf PLA, PVP, *I.H* ve AMG'nin moleküler yapıları ve elektro-eğirme yöntemleriyle üretilen PLA ve PVP içeren fiber, sadece bitki ekstraktlı, sadece ticari ilaçlı, ayrı katmanlı, birbiriyle karıştırılmış tüm nanofiber yama örnekleri Şekil 3.3'de verilmiştir. Başlıca karakteristik absorbe bantları, 1750 cm^{-1} 'de C=O titreşim piki, 1456 cm^{-1} 'de CH_3 asimetrik kayma, 1386 cm^{-1} ve 1358 cm^{-1} 'de CH_3 ve C-H bükülme titreşimleri, C-O-C gerilmesi ile ilgilidir. Şekil 3.3 A(a)'da saf PLA için 1265 cm^{-1} 'de titreşim, 1080 cm^{-1} 'de C-O-C gerilmesi, C- CH_3 gerilmesi, 950 cm^{-1} 'de OH bükülmesi ve 873 cm^{-1} 'de C-COO gerilmesi sırasıyla ölçülmüştür [102]. FTIR spektrumları, Şekil 3.3 A(b)'de PVP'nin CH_2 sallanmasına atanmış yaklaşık 1017 cm^{-1} 'lik bir bant göstermektedir. Yaklaşık $1268,65 \text{ cm}^{-1}$ 'lik bir zirve ise PVP'nin CH_2 'sinin bükülmesine işaret etmektedir. Yaklaşık $1284,36 \text{ cm}^{-1}$ 'lik zirve, C-N gerilmesini veya C-O gerilmesini gösterdi ve yaklaşık $1650,77 \text{ cm}^{-1}$

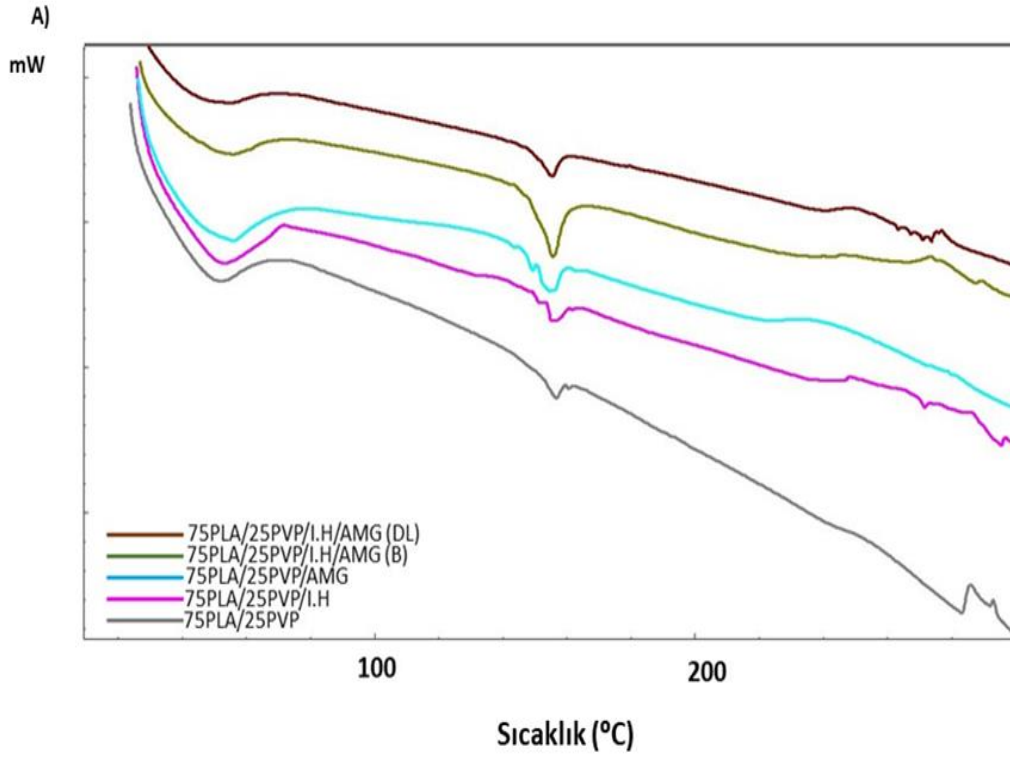
¹H bant, PVP'nin C=O gerilmesine işaret eder [103]. Şekil 3.3 A(c) bileşenindeki AMG'nin FTIR spektrumundaki titreşim bantları 1620 cm⁻¹ ve 1455 cm⁻¹ (aromatik C=C gerilme), 2885 cm⁻¹ (alifatik C-H gerilme) ve 2932 cm⁻¹ (aromatik C-H streç) şeklindedir. OH gerilmesini gösteren zirve 3367 cm⁻¹'dir [104]. Şekil 3.3 A(d)'deki *I.H*'nin FT-IR spektrumu, 3402,11 cm⁻¹'de geniş bir tepe ve 2923,56 cm⁻¹'de zayıf bir tepe gösterir; CH² gruplarının O-H gerilme titreşimini ve C-H gerilme titreşimini gösterir ve soğurma tepe noktasını işaret eder. Suyun soğurulması 1751,05 cm⁻¹ olarak gösterilmiş ve 1592,91 cm⁻¹'deki soğurma bandına C-H titreşimi belirlenmiştir. C-O-C halkası gerilme titreşimleri ve C-O gerilme titreşimleri nedeniyle 1035,59 cm⁻¹ ve 981,59 cm⁻¹ noktaları soğurma tepe noktalarıdır. 860,10 cm⁻¹ ve 819,60 cm⁻¹ 'deki iki absorpsiyon bandı, β-tipi glikosidik bağın ve şeker 2-ketofuranozun varlığını gösterir [105]. Şekil 3.3 B(h)'deki AMG ve *I.H* yüklü nanofiberli yama için FT-IR spektrumlarında farklı yoğunluklara sahip benzer zirveler elde edildi. Bu sonuçlara göre formülasyon ve kapsüllemenin başarılı olduğu söylenebilir.



Şekil 3.3. (A) a) saf PLA, b) saf PVP, c)AMG ilacı, d)*I.H* bitkisinin FTIR spektrumları.
 (B) e)75PLA/25PVP, f) 75PLA/25PVP/*I.H*, g) 75PLA/25PVP/AMG, h)
 75PLA/25PVP/*I.H*/AMG (K), j)75PLA/25PVP/*I.H*/AMG (ÇK) nanofiberlerin FTIR
 spektrumları

3.3.Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi (DSC)

DSC grafiğindeki tepe çizgileri, Şekil 3.4'de üretilen elyafların camsı geçiş sıcaklığı (T_g) ve erime sıcaklığı (T_m) olarak sıcaklığa yapısal tepkilerini incelemek için kullanılır. 75PLA/25PVP, 75PLA/25PVP/*I.H*, 75PLA/25PVP/AMG, 75PLA/25PVP/*I.H*/AMG (K) ve 75PLA/25PVP/*I.H*/AMG (ÇK) elektrospinning fiberlerinin DSC termogramları gösterilmektedir. Nanofiberli yamanın camsı geçiş sıcaklıkları sırasıyla şu şekildedir: 52,09 °C, 53,32 °C, 55,89 °C, 55,96 °C, 55,27 °C. Tek başına *I.H* eklendiğinde, 75PLA/25PVP nanofiberin cam geçiş sıcaklığını hafifçe arttırdı. AMG ilacı tek başına eklendiğinde de benzer bir artış gözlemlendi. İki aktif maddenin bir arada kullanılması durumunda camsı geçiş sıcaklığının daha fazla arttığı gözlemlendi. Tek bir cam geçiş sıcaklığı zirvesine sahip nanofiberli yamaların bu ısı değerleri ve faz ayrımının olmaması, polimerler arasındaki dispersiyonlar ve etkileşimlerden kaynaklanabilir [102]. Erime noktaları hafif bir düşüşle sırasıyla şu şekildedir: 156,73 °C, 155,32°, 154,75 °C, 155,65 °C, 155,45 °C. Cam ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada intravajinal nanofiber yamaya eklenen steroid hormon progesteron P4'ün termal davranışı incelendiğinde saf PLA'ya eklenen P4 hormonunun T_m değerini düşürdüğü belirlendi. Bunun, PLA kristalliğinin P4 progesteron hormonu tarafından moleküller arası etkileşim yoluyla baskılanmasından kaynaklandığı belirtilmektedir [106]. Benzer şekilde, AMG ve *I.H* katkı maddeleri eklendiğinde saf grup 75PLA/25PVP'deki erime sıcaklığı, moleküller arası etkileşim nedeniyle bir miktar azalmış olabilir.



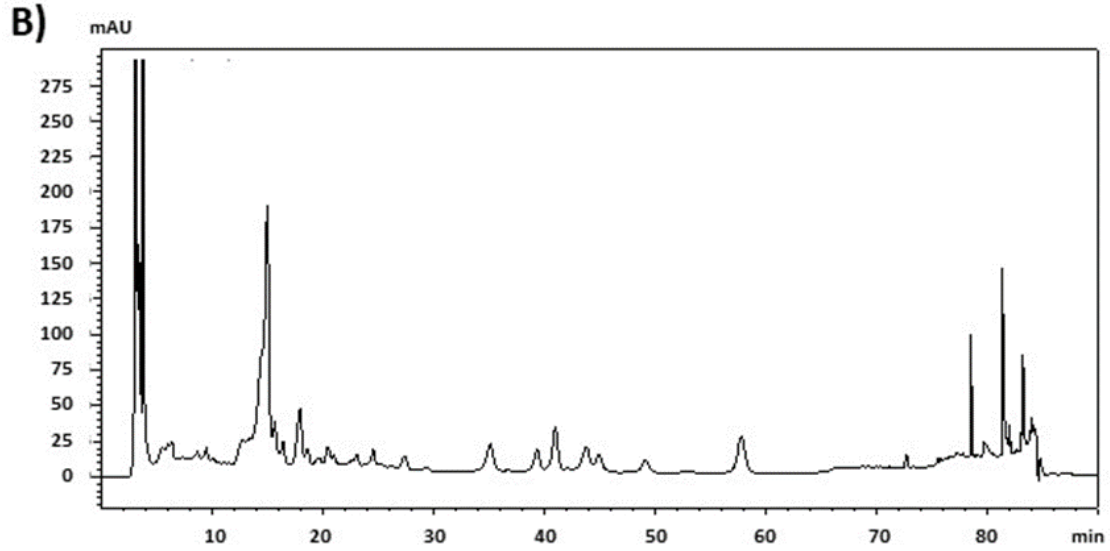
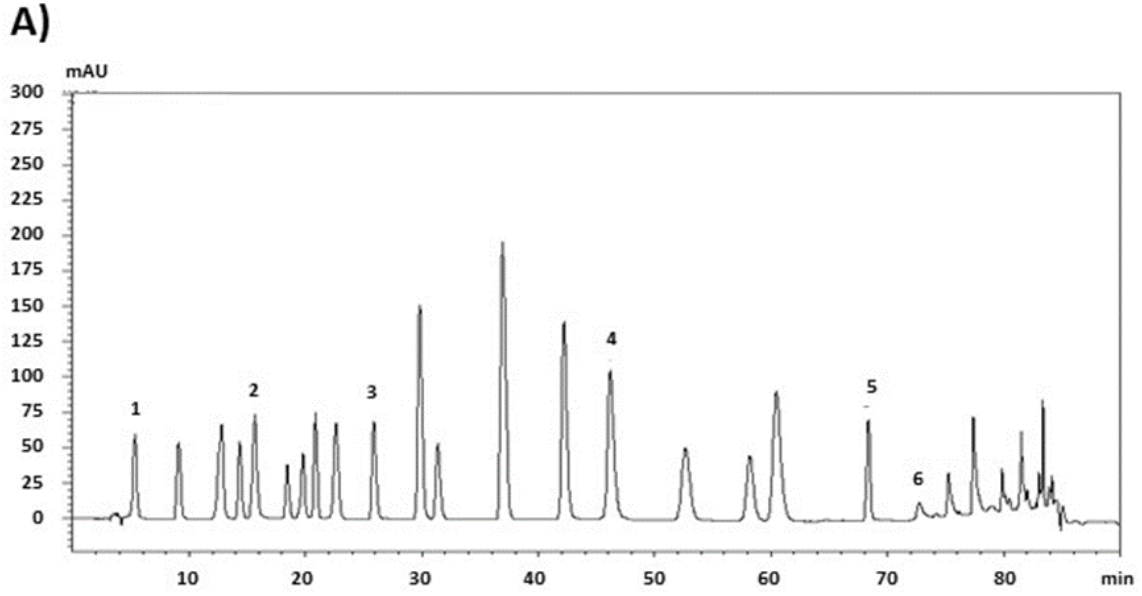
Şekil 3.4. Nanofiberlerin DSC eğrileri

3.4.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi HPLC

I.H ekstraktının fenolik bileşenlerini belirlemek için HPLC analizi yapıldı ve analiz sonuçları Şekil 3.5'de belirtildiği gibi tanımlandı. Toz halinde kullanılan *I.H* ekstraktı, kromatogramda en çok dikkat çeken 5 fenolik asit içeriğine sahiptir. Bu fenolik asitler, Şekil 3.5'de sırasıyla klorojenik asit 12205,9 $\mu\text{g/g}$, rutin 1353,1 $\mu\text{g/g}$, kuersetin 80,7 $\mu\text{g/g}$, sinamik asit 19 $\mu\text{g/g}$ ve p-kumarik asit 11 $\mu\text{g/g}$ 'dir.

Aybastır tarafından DNA onarım mekanizması üzerine yapılan bir çalışmada, *I.H* bitkisinden elde edilen HPLC sonuçlarında klorojenik asit varlığı tespit edilmiş ve çalışmamızın sonuçlarına paralel veriler elde edilmiştir [107]. Petkova ve ark. yüksek bir antioksidan etki elde etmek için *I.H* bitkisinin ekstraktını inceledi. Klorojenik asit fenolik bileşenin en bol bulunan bileşen olduğu sonucuna vardılar. Zengin fitokimyasal içeriği nedeniyle *I.H*, bazı Avrupa farmakopelerinde resmi olarak listelenmiştir. Bitki kökleri laktonlar, timol türevleri, triterpenler, sterol, fenolik asitler ve flavonoidler içerir [108], [109]. Bu fenolik bileşikler arasında antikanser aktiviteye sahip beş ana bileşen olan

kersetin, rutin, sinamik asit, klorojenik asit ve p-kumerik asit, kalibrasyon eğrilerinin regresyon denklemleri kullanılarak ölçüldü.

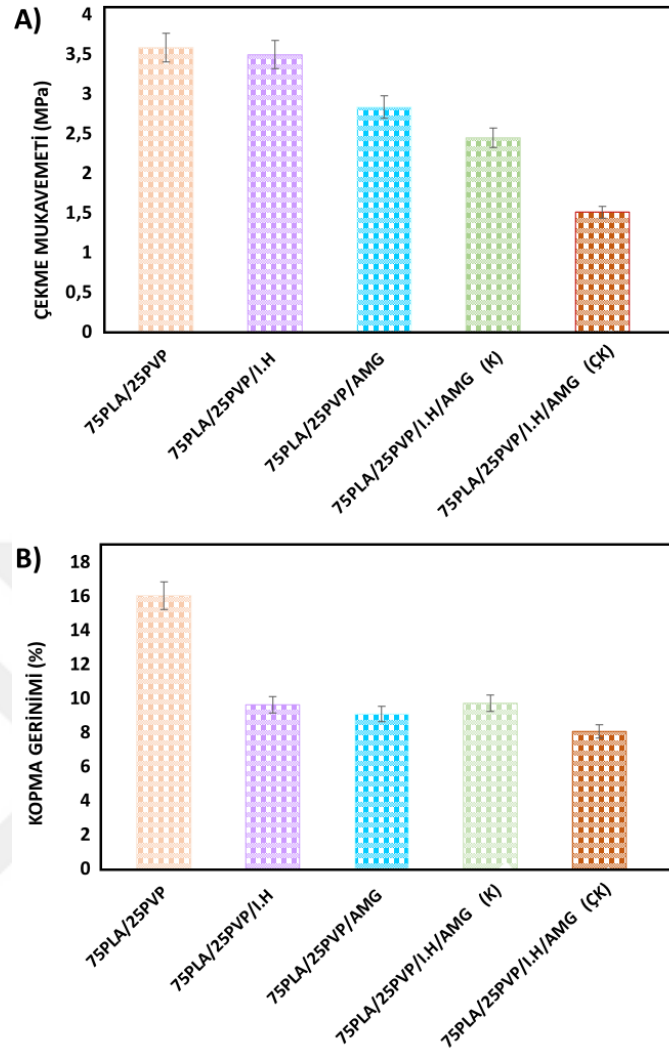


Şekil 3.5. Ekstraktın ve standartın 278 nm’de HPLC kromatografisi. (A) Pik 1: gallik asiti pik 2: klorojenik asit, pik 3: p-kumarik asit, pik 4: rutin, pik 5: sinamik asit ve pik 6: kuersetin

3.5.Mekanik Analiz

Kolon kanseri tedavisi için üretilen beş farklı nanofiber modelin çekme mukavemeti (MPa) ve kopmada gerinim (%) test sonuçları Şekil 3.6'da gösterildiği gibidir. 75PLA/25PVP polimer kombinasyonundan oluşan saf grubun çekme mukavemeti değeri $3,581 \pm 0,594$ MPa. 75PLA/25PVP/*I.H* isimli *I.H* yüklü grubun çekme mukavemeti hafif bir düşüşle 3.495 ± 0.969 MPa'ya gerilemiştir. 75PLA/25PVP/AMG olarak adlandırılan amigdalin yüklü nanofiber grubu ise daha keskin bir düşüş göstererek $2.833 \pm 0,547$ MPa'da ölçüm sonucu vermiştir. *I.H* ve AMG'nin karıştırılıp birlikte yüklendiği 75PLA/25PVP/*I.H*/AMG (K) isimli nanofiberlerin çekme mukavemeti bir miktar azalarak 2.449 ± 1.141 MPa olmuştur. 75PLA/25PVP/*I.H*/AMG (ÇK) olarak adlandırılan ve iki aktif maddenin ayrı katmanlar halinde üretildiği nanofiberli iskelenin çekme mukavemeti $1,508 \pm 0,784$ MPa'dır.

Polimere aktif maddelerin eklenmesi, üretilen nanofiberlerin gerilmesini etkilemiştir [110]. Stoyanova ve ark. PLA nanofiberlerine eklenen bitki ekstraktının güçlü antioksidan aktivitesinden dolayı mekanik özellikleri azalttığını göstermektedir. Bunun nedeni düşük moleküler ağırlıklı bileşiğin PLA matrisine karıştırılmış olması olabilir. Kopmadaki gerinim (%) testi sonuçları tüm gruplar için sırasıyla şu şekildedir: $16,028 \pm 5,928$, $9,633 \pm 1,179$, $9,069 \pm 1,830$, $9,715 \pm 2,52$, $8,056 \pm 7,970$; 75PLA/25PVP, 75PLA/25PVP/*I.H*, 75PLA/25PVP/AMG, 75PLA/25PVP/*I.H*/AMG (K) ve 75PLA/25PVP/*I.H*/AMG (ÇK). Sonuçlara göre çift katmanlı olarak üretilmesine rağmen kopma gerilimi en düşük nanofiber grubu 75PLA/25PVP/*I.H*/AMG (ÇK) olmuştur. Cesur ve ark. makale çalışmalarında ilaç katkı maddelerinin çift katlı üretimde elyafın mekanik mukavemetini azalttığı yönündeki bulgularını desteklemiştir [74].

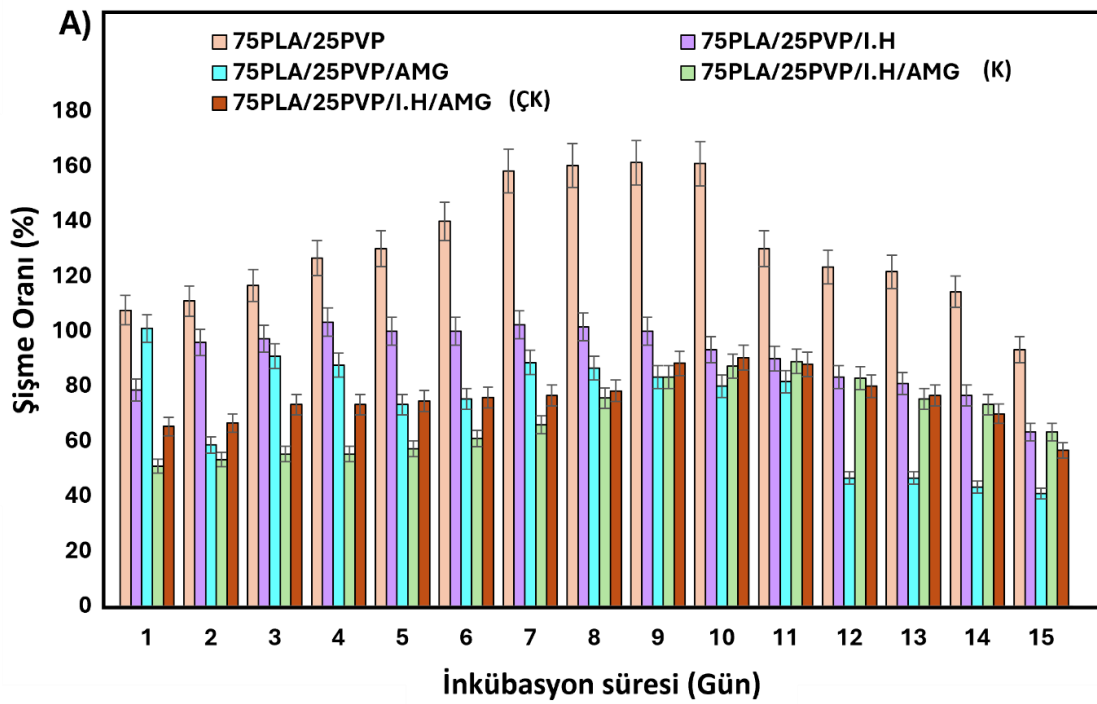


Şekil 3.6. Çekme mukavemeti (MPa) ve Kopma gerinim (%) grafikleri

3.6.Şişme-Bozunma Testi

Hücre tutunması, çoğalması ve büyümesi gibi etkileri olduğundan şişme biyomateryaller için önemlidir [111], [112]. Şekil 3.7'de fiber gruplarının zamana bağlı şişme oranları verilmiştir. Şişme testi için insan vücudunun biyolojik sıvısını en iyi taklit edebilen PBS solüsyonu (pH: 7,4) ile 15 gün boyunca şişme testi yapılarak nanofiberli numunelerin şişme performansı incelenmiştir. 15 günlük sonuca göre 75PLA/25PVP grubu en yüksek şişme oranına sahipken, diğer grupların şişme oranlarında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Şekil 3.7'de verilen grafiğe göre nanofiber liflerin 10. güne kadar şişme davranışı gösterdiği görülmektedir. 10. günde şişme oranı 75PLA/25 PVP için %161 iken, aynı gün 75PLA/25PVP/AMG yüklü nanofiber fiber grubu %80 oranıyla en az şişme profiline

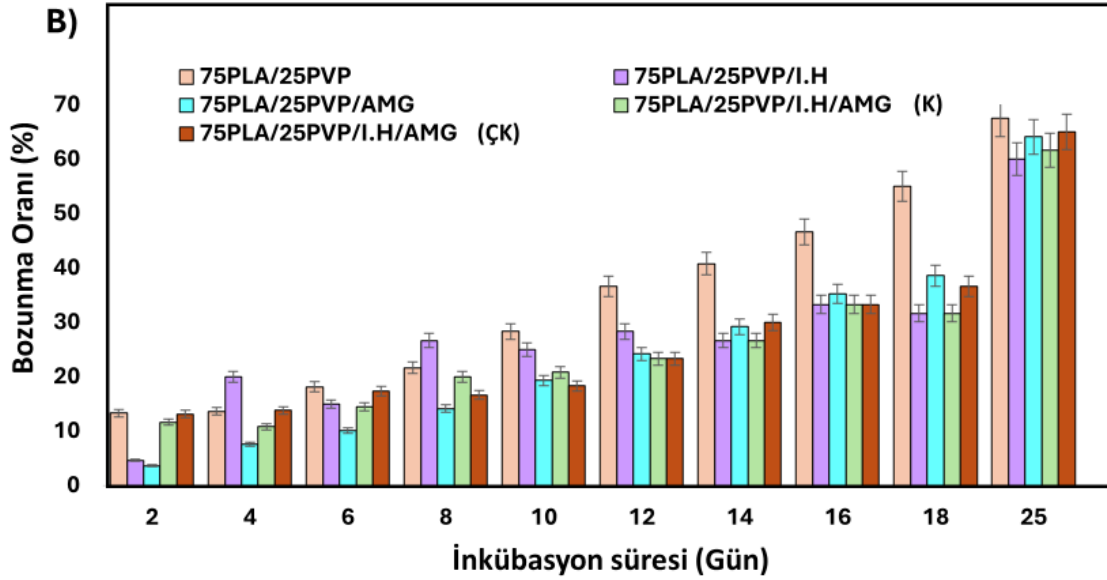
sahip olmuştur. 15 gün sonunda en çok su emen grup %93,33 oranıyla 75PLA/25PVP olurken, en az su emen grup ise %41 oranıyla 75PLA/25PVP/AMG olarak ölçülmüştür. Daha yüksek su emiciliğe sahip nanofiberlerin daha hızlı bozunduğu bilinmektedir [113]. Bu nedenle 25 günlük dönemde 75PLA/25PVP nanofiber grubu daha fazla su emdiği için diğer gruplardan daha hızlı bozunmuş olabilir. Hidrofilik bileşenin bozulmasına bağlı olarak zamanla şişme oranının azalması nedeniyle PLA/PVP içeren liflerin şişme hızı da zamanla azalmıştır. Tüm nanofiberli liflerde 75PLA ve 25PVP oranı aynı olduğundan sonuçlar karşılaştırıldığında şişme oranları birbirine yakındır [114].



Şekil 3.7. Şişme testi grafikleri

Bozunma, doku mühendisliği çalışmalarında biyomateryallerin önemli bir özelliğidir. İskelelerin doku yenilenmesini sağladıktan sonra zamanla bozunması beklenir [115]. PBS'de saklanan malzemeler zamanla ayrışır ve tartım sırasında kütlelerini kaybeder. Ayrıca nemli ortamda tutulduktan sonra PLA'nın ana zincirindeki ester grupları parçalanır ve bu parçalanmaya bağlı olarak PLA'nın moleküler ağırlığı azalır [116], [117]. Şekil 3.8'e göre nanofiberli grupların bozunmasının izlenmesi sonucunda 75PLA/25PVP'den oluşan saf grup en hızlı bozunma oranına sahip gruptur. AMG ilaç yüklü grup en düşük bozulma oranına sahip olmuştur. 25 gün sonunda 75PLA/25PVP grubu %67,5 oranında bozunma

orani gösterirken, diğer grupların bozunma oranı sırayla şu şekilde oldu; 75PLA/25PVP/IH/AMG (ÇK), 75PLA/25PVP/AMG, 75PLA/25PVP/IH/AMG (K), 75PLA/25PVP/IH; %65, %64,15, %61,66, %60'tur. Bu sonuçlara göre *I.H* bitki ekstraktının bozunma hızına diğerlerine göre daha az etki ettiği söylenebilir. Mousa ve arkadaşlarının çalışmasında hidrofobik polimer olarak kullanılan PLA nanofiberlerinin kabaca yavaş bozunduğu gözlemlenmiştir [118]. PLA hidrofobik bir polimer olduğundan bozunması uzun zaman alır. Nanofiberli yapımızda PLA oranı %75, PVP oranı ise %25'tir. Bu nedenle nanofiberler yavaş bozunma davranışı göstermiş olabilir. Bu çalışmada nanofiberlere *I.H* ve AMG eklenmesinin şişme ve bozulma sonuçları üzerinde çok hafif bir etkisi olmuştur.

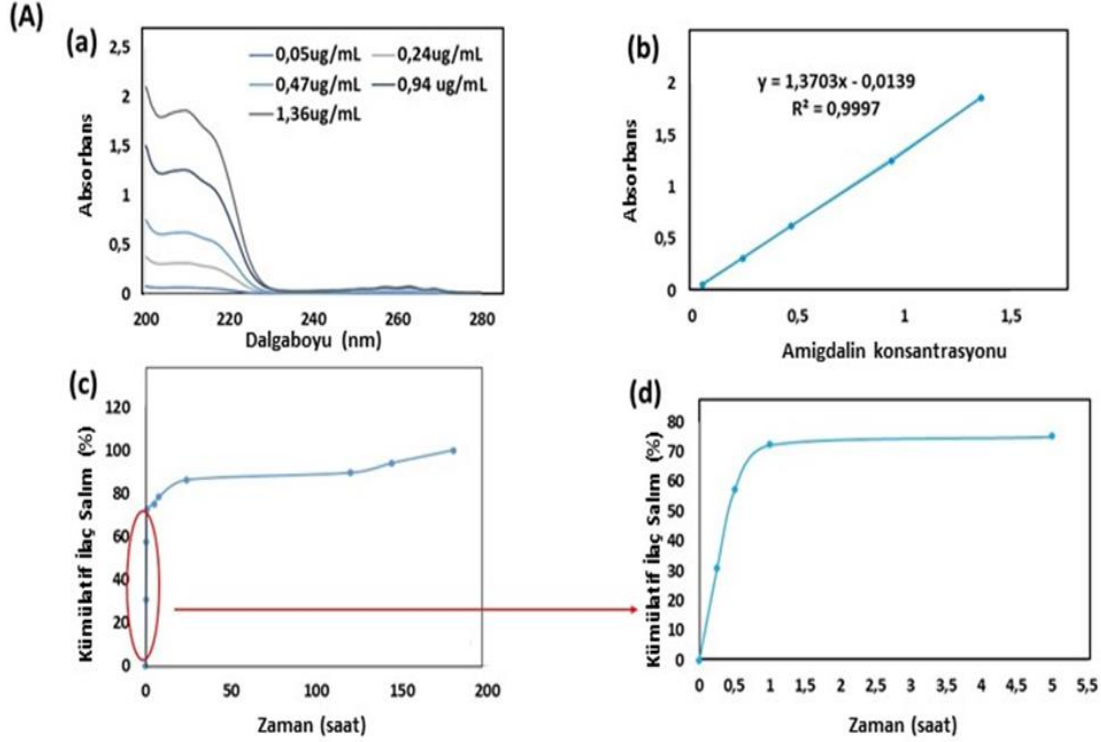


Şekil 3.8. Bozunma testi grafikleri

3.7. *İn-vitro* İlaç Salım Testi

Kolon kanseri tedavisi için üretilen nanofiberli yamalara yüklenen *I.H* ve AMG etken maddelerinin ilaç salım özelliklerini değerlendirmek amacıyla *İn-vitro* ilaç salım testi yapıldı. UV spektrumları belirlendi ve kalibrasyon eğrileri çizildi. Fizyolojik koşulları eşitlemek için PBS içeren bir ortamda salımlar yapıldı. Salınan AMG (R^2 : 0,9997) ve *I.H* (R^2 : 0,9921) için absorbans değerleri UV 218 nm ve 345 nm'dir. Şekil 3.9 A (d)'de AMG yüklü nanofiber yamanın %72,27'sinin ilk 60 dakikada salındığı görülmektedir. İlk

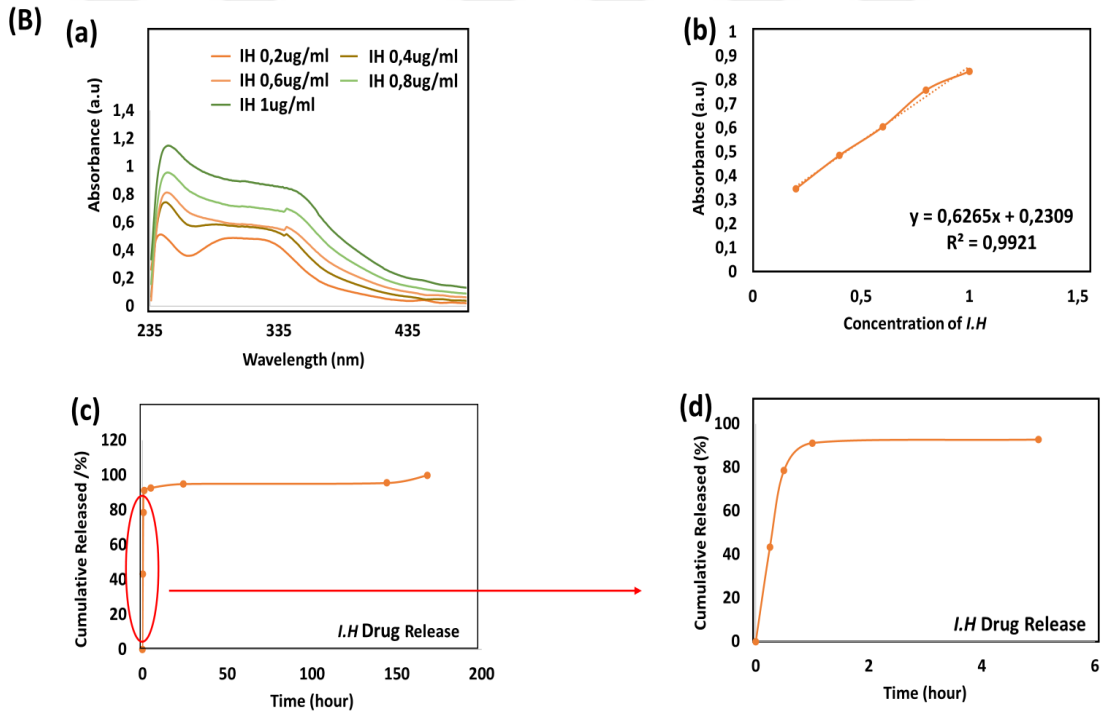
saatten sonra salınım yavaş ve sürekli bir eğime doğru ilerliyor. Seyhan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farklı miktarlarda AMG ilacı yüklenen PLA/PEG nanofiberlerinin ilk 90 dakikaya kadar hızlı bir ilaç salım performansı gösterdiği görülmüştür. AMG ilacının nanofiberli bir yamada tipik iki aşamalı ilerleme profilini gösterdiği gözlemlendi [119].



Şekil 3.9. a) Amigdalin ilacının UV absorbans spektrumları, b) 218nm’de amigdalinin standart eğrisi, c) Amigdalin yüklü nanofiberin *in-vitro* salım eğrisi 0-200 saat aralığı, d) Amigdalin yüklü nanofiberin *in-vitro* salım eğrisi 0-5,5 saat aralığı

Şekil 3.10 (d)'de *I.H* yüklü nanofiberli yamanın 24 saatte salınımının %95,15 olduğu belirlendi. Chou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ilaç yüklü nanofiberlerin çapı arttıkça salınım hızının yavaşladığı belirtildi. Araştırmada büyük çaplı fiberler ile küçük çaplı fiberler karşılaştırıldığında küçük çaplı fiberlerin ilacı daha hızlı saldırdığı görüldü [120]. Daha yüksek ilaç yüklemesi, yüzeyle ilişkili ilacın daha önemli miktarları ve liflerin daha yüksek yüzey alanı nedeniyle sıklıkla patlama salımının artmasıyla sonuçlanır. AMG ilacı ile karşılaştırıldığında *I.H* daha hızlı ilaç salımı sonucu sağlar. İlk saat içinde bir karşılaştırma yapıldığında, 525,34 nm çapındaki *I.H*. yüklü fiber, 536,95 nm çapındaki AMG yüklü fiberden daha yüksek oranda ilaç saldı. Salım çalışmaları, daha büyük çaplı liflerin, daha küçük liflerden daha yavaş salındığını göstermiştir. İlaç

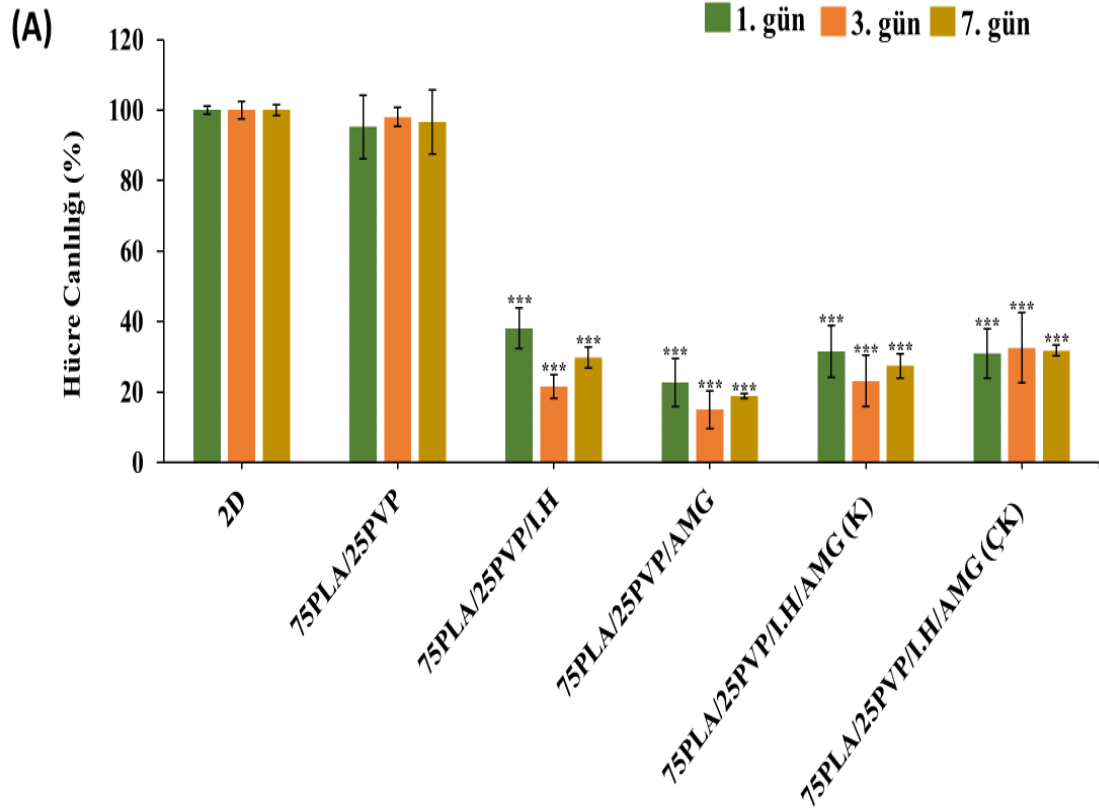
salımındaki bu değişimler, farklı lif formülasyonlarındaki şişme davranışları ve ilaç çözünürlükleriyle beraber dolaylı yoldan lif çapından etkilenerek de salımdaki farklılaşma durumlarını meydana getirebilir [121]. Önceki çalışmalarda bildirildiği gibi, hidrofilitesi yüksek özelliklere sahip küçük moleküllü ilaçların salınmasının sebebi su da çözünürlük kaynaklı daha hızlı difüzyon veya patlama salımına yatkın olmasıdır [122]. Sonuç olarak, AMG ve *I.H*'nin nano lifli yamadan salınmasının tamamlanması 180 saat kadar sürdü. Her iki madde için de çeşitli konsantrasyonlarda çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada optimum konsantrasyonlar belirlenerek incelenmiştir [123].



Şekil 3.10. a) *I.H* bitki ekstraktının UV absorbans spektrumları, b) 345nm’de *I.H* bitki ekstraktının standart eğrisi, c) *I.H* yüklü nanofiberin *in-vitro* salım eğrisi 0-200 saat aralığı, d) Amigdalın yüklü nanofiberin *in-vitro* salım eğrisi 0-6 saat aralığı.

3.8. *In-vitro* Sitotoksite Analizi

Farklı şekillerdeki AMG ve *I.H* ile yüklenenlerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri, HCT-116 hücre hattında 1, 3 ve 7 günlük MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmada üretilen ana fiber materyalinin (75PLA/25PVP) HCT-116 hücreleri için toksik olmadığı, kontrol grubuyla (2D) karşılaştırıldığında sırasıyla 1, 3 ve 7. günlerde %95,24 olduğu rapor edilmiştir. Şekil 3.11'de *I.H*, AMG yüklü ve kombine ana fiber materyal gruplarında hücre canlılığının %98,05 ve %96,7 oranında önemli derecede toksik seviyelerde olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde hem AMG hem de *I.H*. nanofiberli yamalara yüklenen malzemeler kanser hücresi ölümünde olumlu sonuçlar veriyor. AMG ve *I.H* ile karşılaştırıldığında AMG nanofiberleri HCT-116 kolon kanseri hücre hattında daha az canlı hücre davranışı göstererek daha etkili sonuç vermiştir. En anlamlı azalma, yalnızca AMG yüklü 75PLA/25PVP/AMG grubunda yaşanmıştır. 3. gün AMG ve *I.H* yüklü liflerin hücre canlılığının azalmasında etkinin en yüksek olduğu gün olmuştur. AMG ve *I.H*'nin karıştırılıp fiber üzerine yüklendiği grup, ayrı ayrı katmanlar halinde yüklendiği gruba göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Aktif bileşenlerin karıştırıldığı ve nanofiberlere yüklendiği grupta, tek tek çift katmanlı yüklemeye göre daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Kyung-Nam ve arkadaşlarının çalışmasında AMG'nin kolon kanseri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Gözlemlenen sonuçlara göre AMG ilacının kolon kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Bu sitotoksik etki, ilaç konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak hücre canlılığının azalmasına neden olmuştur [124]. Dorn ve ark. *I.H* ekstraktını dört tümör hücre tipi üzerinde test etti: HT-29 (kolon kanseri), MCF-7 (meme kanseri), Capan-2 (pankreas kanseri) ve G1 (astrozitom). MTT testi sonucunda dört tümör hücre hattının tamamında oldukça toksik etki elde eden Dorn ve ark. *I.H*'nin antikanser araştırmalarında kullanılmak üzere mükemmel bir aday olduğunu göstermiştir. *I.H* ekstraktı ile öldürülen hücreler elektron mikroskobu altında incelendiğinde, HT-29 kolon kanseri hücrelerinin görüntülerinde kromatinin düzensiz yoğunlaşması ve şişmiş mitokondrinin yırtılması gibi elde edilen bulgular MTT sonuçlarıyla paralel sonuçlar göstermiştir [125].



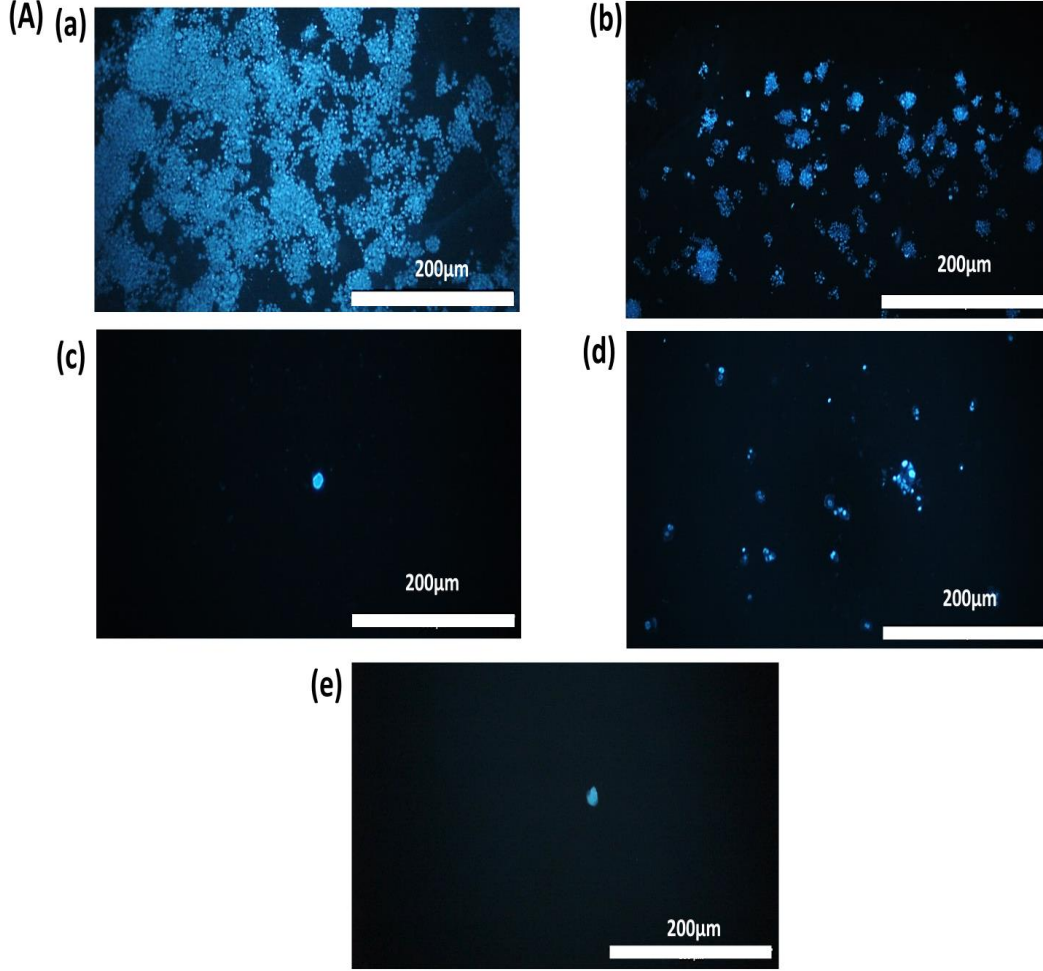
Şekil 3.11. Nanofiberlerin 1, 3 ve 7 günlük hücre canlılık testi

3.8.1. DAPI Boyama Testi

Üretilen nano lifli grupların floresan görüntüleri, Şekil 3.12'de hücre ekim tespitinde kullanılan floresan tekniklerinden biri olan ve üretilen fiber malzemelerin biyoyoumluluğunun gösterildiği DAPI boyama yöntemiyle incelendi. Floresan görüntülerde hücrelerin zar bütünlüğündeki değişiklikler, hücre zarı asimetrisinin kaybı, DNA parçalanması gibi sebeplerden kaynaklanabilecek hücre ölümleri meydana gelmiştir [126].

Hücre ölümünün gerçekleştiği bölgelerde floresans yoğunluğu daha düşük iken, canlı hücrelerin bulunduğu bölgelerde yoğunluk daha yüksektir. Beklenen hücre yapışması, hiçbir aktif madde içermeyen ve yalnızca polimer kombinasyonundan oluşan saf grupta mevcuttur. Mavi boya görüntüsüne sahip bölgeler, kolon kanseri hücrelerinin yoğunluğu

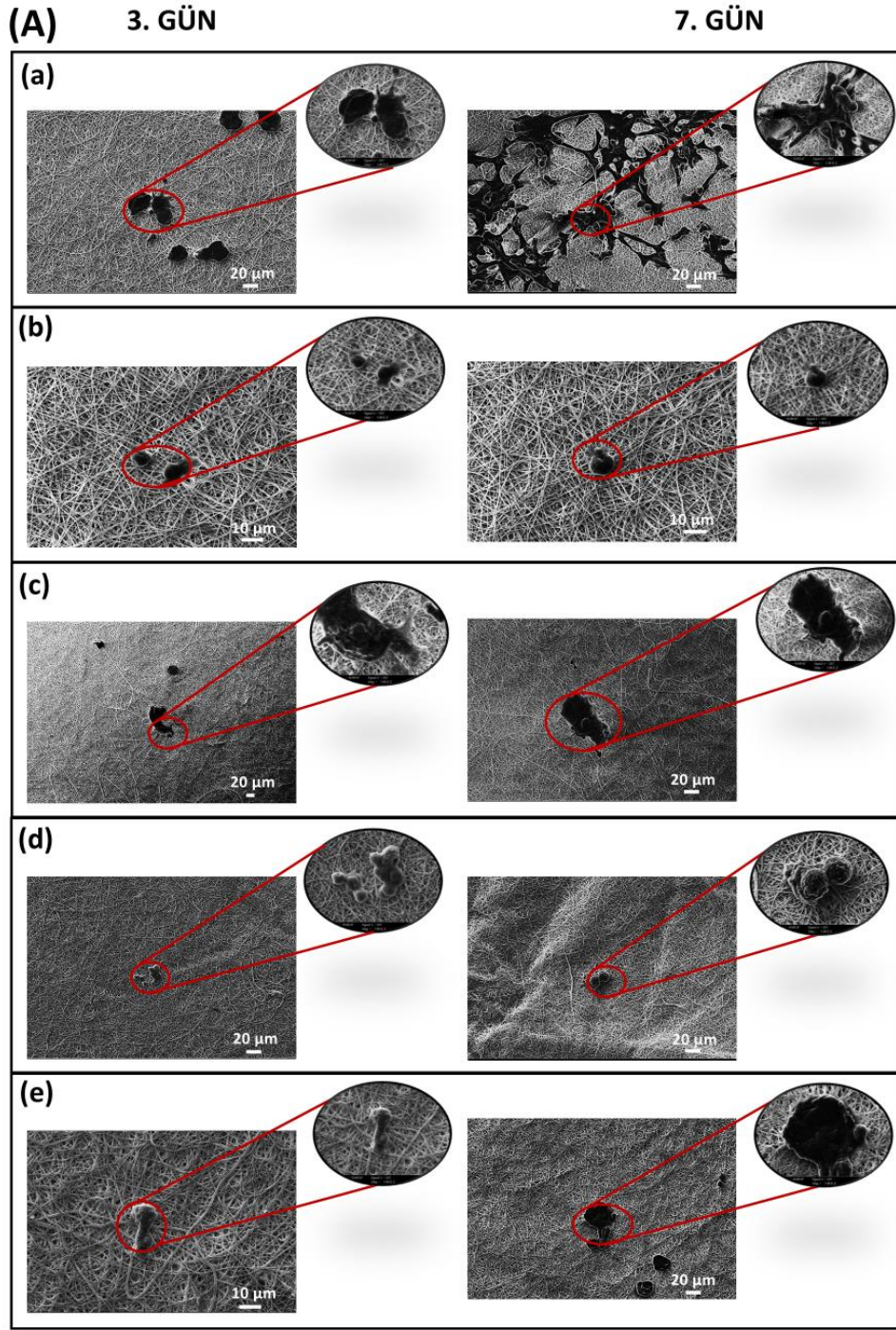
ve kümelenmesi nedeniyle daha belirgin floresans göstermiştir. Diğer gruplarda kullanılan aktif maddelerin etkisiyle yapışma çok az aktivite göstermiştir.



Şekil 3.12. DAPI boyama yöntemiyle nanofiberlere ait 7 günlük floresan görüntüleri

3.8.2. Hücre Tutunmasının Morfolojik Analizi

Şekil 3.13'de verilen SEM görüntüsüne göre fiber grupları arasında *I.H* içeren nanofiber grubu AMG ilacı içeren grupla karşılaştırdığımızda AMG içeren 75PLA/25PVP/AMG grubu daha az bağlanma gösterdi. Bu durum lif içeren AMG ilaçlarının hücre ölümü üzerindeki etkisiyle açıklanabilir.



Şekil 3.13. Nanofiberlere ait 3 ve 7 günlük hücre tutunma analizi sonucunun taramalı elektron mikroskop (SEM) sonuçları

4. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, elektro-eğirme yöntemi kullanılarak, kolon kanseri tedavisi için AMG ve *I.H* yüklü beş farklı nanofiber yama grubunu başarıyla üretilerek elde edilen değerlendirildi. AMG ve *I.H* yüklü fiberlerin SEM sonuçlarında homojen dağılmış, boncuksuz nanofiberli görüntüler elde edildi. Mekanik dayanım testinde 75PLA/25PVP/*I.H*/AMG (ÇK) grubu, 75PLA/25PVP/*I.H*/AMG (K) grubuna göre daha az mekanik dayanım göstermiştir. İlaç salım sonuçları incelendiğinde 24 saat sonunda AMG ve *I.H* yüklü nanofiber yamaların sırasıyla %86,23 ve %95 oranında salındığı görülmüştür. Her iki aktif maddenin de 180 saate kadar salımı sağlandı. In-vitro sitotoksikite çalışmalarına göre aktif içerik yüklü tüm nanofiberli gruplar, kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etki gösterdi. AMG ve *I.H*'nin tek başına kullanımı hücre üzerinde sitotoksik etki gösterirken, daha da önemlisi bunların birlikte kullanılması kolon kanseri hücrelerini de öldürdü. Kombinasyon çeşitlerini karşılaştırdığımızda harman kombinasyonunun çift katlı kombinasyonuna göre daha iyi sonuçlar verdiğini söylemek mümkündür. Kanser meydana geldiği karmaşık bağırsak organında, elektro-eğirme yöntemi ile tümör bölgesine özel boyutlarda, geometrik formlarda ve esneklikte üretilen AMG ve *I.H* yüklü nanofiber yamalar, yarayı cerrahi olarak kaplayıp çevreleyebiliyor. Bu nedenle, bu çalışmadaki nanofiber yama, kolon kanseri tedavisinde tümör dokularını azaltmak ve sağlıklı doku rejenerasyonu sürecini başlatmak için postoperatif tıbbi uygulamalarda kullanılabilir umut verici bir biyomateryal olabilir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında elektro-eğirme yöntemi ile kolon kanseri tedavisinde kullanılmak üzere aktif bileşenleri kolon kanseri hücreleri üzerinde etkili olan bir bitki ekstresi ve bir ticari ilaç katkısıyla nanofiberli yara örtüsü üretildi, karakterize edildi ve farklı kombinasyonların sonuçları birbirleriyle karşılaştırılarak tedaviyi destekleyici bir yama örtüsü tasarlandı.

5. KAYNAKLAR

- [1] R. L. Siegel, A. N. Giaquinto, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2024," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 74, no. 1, pp. 12–49, Jan. 2024, doi: 10.3322/caac.21820.
- [2] N. Alrushaid, F. A. Khan, E. Al-Suhaimi, and A. Elaissari, "Progress and Perspectives in Colon Cancer Pathology, Diagnosis, and Treatments," *Diseases*, vol. 11, no. 4, p. 148, Oct. 2023, doi: 10.3390/diseases11040148.
- [3] C. Jin, K. Wang, A. Oppong-Gyebi, and J. Hu, "Application of Nanotechnology in Cancer Diagnosis and Therapy - A Mini-Review," *Int. J. Med. Sci.*, vol. 17, no. 18, pp. 2964–2973, 2020, doi: 10.7150/ijms.49801.
- [4] I. Pacal, D. Karaboga, A. Basturk, B. Akay, and U. Nalbantoglu, "A comprehensive review of deep learning in colon cancer," *Comput. Biol. Med.*, vol. 126, no. September, p. 104003, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.combiomed.2020.104003.
- [5] G. M. Cooper and R. E. Hausman, "The development and causes of cancer. The cell: a molecular approach," *Darby S., Hill D., Auvinen A., Barros-Dios JM, Baysson H., Bochicchio F., Deo H., Falk R.(2005). Radon homes risk lung cancer Collab. Anal. Individ. data from*, vol. 13, pp. 223–228, 2000.
- [6] A. Carrel, "MECHANISM OF THE FORMATION AND GROWTH OF MALIGNANT TUMORS," *Ann. Surg.*, vol. 82, no. 1, pp. 1–13, Jul. 1925, doi: 10.1097/00000658-192507010-00001.
- [7] V. N. Anisimov, "The relationship between aging and carcinogenesis: a critical appraisal," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 45, no. 3, pp. 277–304, Mar. 2003, doi: 10.1016/S1040-8428(02)00121-X.
- [8] C. E. Meacham and S. J. Morrison, "Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity," *Nature*, vol. 501, no. 7467, pp. 328–337, Sep. 2013, doi: 10.1038/nature12624.
- [9] E. N. KONTOMANOLIS *et al.*, "Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review," *Anticancer Res.*, vol. 40, no. 11, pp. 6009–6015, Nov. 2020, doi: 10.21873/anticancer.14622.

- [10] C. H. Golias, A. Charalabopoulos, and K. Charalabopoulos, "Cell proliferation and cell cycle control: a mini review," *Int. J. Clin. Pract.*, vol. 58, no. 12, pp. 1134–1141, Oct. 2004, doi: 10.1111/j.1742-1241.2004.00284.x.
- [11] Y. Lee and C.-K. Lee, "Classification of multiple cancer types by multicategory support vector machines using gene expression data," *Bioinformatics*, vol. 19, no. 9, pp. 1132–1139, Jun. 2003, doi: 10.1093/bioinformatics/btg102.
- [12] W. Yan, I. I. Wistuba, M. R. Emmert-buck, and H. S. Erickson, "SCC highlights and insights," *Am J Cancer Res*, vol. 1, no. 3, pp. 275–300, 2011.
- [13] I. Nissenkorn, D. Slutzker, E. Schujman, S. Slutzki, and C. Servadio, "Urinary cytology in superficial transitional cell carcinoma of the bladder," *Harefuah*, vol. 105, no. 12, 1983.
- [14] A. VG, R. Banerjee, and D. Bandopadhyay, "Epidemiology, Pathology, Types and Diagnosis of Soft Tissue Sarcoma: a Research Review," *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, vol. 6, no. 3, 2013, [Online]. Available: <http://innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/294>
- [15] H. Tvedten and R. E. Raskin, "Leukocyte Disorders," in *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, Fifth Edit., Elsevier, 2012, pp. 63–91. doi: 10.1016/B978-1-4377-0657-4.00004-1.
- [16] J. E. Whalan, *A Toxicologist 's Guide to Clinical Pathology in Animals; Hematology, Clinical Chemistry, Urinalysis*. 2015.
- [17] H. R. Karrar *et al.*, "Leukemia Perspective in Current Practice," *World Fam. Med. J. /Middle East J. Fam. Med.*, vol. 20, no. 13, 2022, doi: 10.5742/MEWFM.2023.95251581.
- [18] J. Domen, A. Wagers, and I. L. Weissman, "Bone marrow (hematopoeitic) stem cells," *Regen. Med.*, 2006, [Online]. Available: https://www.uv.es/~elanuza/Dinamica/Regenerative_Medicine_2006.pdf#page=17
- [19] M. Hayta and M. Alpaslan, "Apricot Kernel Flour and Its Use in Maintaining Health," in *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease*

- Prevention*, V. R. Preedy, R. R. Watson, and V. B. Patel, Eds. San Diego: Elsevier, 2011, pp. 213–221. doi: 10.1016/B978-0-12-380886-8.10020-0.
- [20] J. S. Abramson, “T-Cell/Histiocyte-Rich B-Cell Lymphoma: Biology, Diagnosis, and Management,” *Oncologist*, vol. 11, no. 4, pp. 384–392, Apr. 2006, doi: 10.1634/theoncologist.11-4-384.
- [21] R. Küppers, A. Engert, and M. Hansmann, “Review series Hodgkin lymphoma,” *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 10, pp. 3439–3447, 2012, doi: 10.1172/JCI61245.Previous.
- [22] S. Shanbhag and R. F. Ambinder, “Hodgkin lymphoma: A review and update on recent progress,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 2, pp. 116–132, Mar. 2018, doi: 10.3322/caac.21438.
- [23] W. N. Rezonek, E. C. Abernathy, and G. J. Tsongalis, “Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications,” *Clin. Chem.*, vol. 43, no. 10, pp. 1814–1823, Oct. 1997, doi: 10.1093/clinchem/43.10.1814.
- [24] R. B. Lersbach, E. D. Hsi, A. Dogan, and F. Fend, “Plasma Cell Myeloma and Related Neoplasms,” *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 136, no. 2, pp. 168–182, Aug. 2011, doi: 10.1309/AJCPENJ68FFBRIYB.
- [25] M. Shapiro-Shelef and K. Calame, “Plasma cell differentiation and multiple myeloma,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 16, no. 2, pp. 226–234, Apr. 2004, doi: 10.1016/j.coi.2004.02.001.
- [26] D. E. Elder, “Skin cancer. Melanoma and other specific nonmelanoma skin cancers,” *Cancer*, vol. 75, no. 1 S, pp. 245–256, 1995, doi: 10.1002/1097-0142(19950101)75:1+<245::AID-CNCR2820751310>3.0.CO;2-7.
- [27] A. Slominski, J. Wortsman, A. J. Carlson, L. Y. Matsuoka, C. M. Balch, and M. C. Mihm, “Special Article Malignant Melanoma An Update,” *Arch Pathol Lab Med*, vol. 125, pp. 1295–1306, 2001.
- [28] R. S. Rogers, “Malignant melanoma in the 21st century,” *Int. J. Dermatol.*, vol. 39, no. 3, pp. 178–179, Mar. 2000, doi: 10.1046/j.1365-4362.2000.00875.x.

- [29] A. Padma Nanthagopal and R. Sukanesh Rajamony, “Classification of benign and malignant brain tumor CT images using wavelet texture parameters and neural network classifier,” *J. Vis.*, vol. 16, no. 1, pp. 19–28, Feb. 2013, doi: 10.1007/s12650-012-0153-y.
- [30] P. M. Kasi, F. Shahjehan, J. J. Cochuyt, Z. Li, D. T. Colibaseanu, and A. Merchea, “Rising Proportion of Young Individuals With Rectal and Colon Cancer,” *Clin. Colorectal Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. e87–e95, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.clcc.2018.10.002.
- [31] H. Sung *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [32] R. Gupta, L. K. Bhatt, T. P. Johnston, and K. S. Prabhavalkar, “Colon cancer stem cells: Potential target for the treatment of colorectal cancer,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 20, no. 8, pp. 1068–1082, Aug. 2019, doi: 10.1080/15384047.2019.1599660.
- [33] O. Castaño, S. Pérez-Amodio, C. Navarro-Requena, M. Á. Mateos-Timoneda, and E. Engel, “Instructive microenvironments in skin wound healing: Biomaterials as signal releasing platforms,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 129, pp. 95–117, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.addr.2018.03.012.
- [34] V. K. Mourya, N. Inamdar, R. B. Nawale, and S. S. Kulthe, “Polymeric micelles: General considerations and their applications,” *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, vol. 45, no. 2, pp. 128–138, 2011.
- [35] Q. Zhou, L. Zhang, and H. Wu, “Nanomaterials for cancer therapies,” *Nanotechnol. Rev.*, vol. 6, no. 5, pp. 473–496, Oct. 2017, doi: 10.1515/ntrev-2016-0102.
- [36] G. S. Kwon and T. Okano, “Polymeric micelles as new drug carriers,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 21, no. 2, pp. 107–116, Sep. 1996, doi: 10.1016/S0169-409X(96)00401-2.
- [37] G. Noh *et al.*, “Development and Evaluation of a Water Soluble Fluorometholone

- Eye Drop Formulation Employing Polymeric Micelle,” *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 4, p. 208, Oct. 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10040208.
- [38] F. Danhier *et al.*, “Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: *In-vitro* and in vivo evaluation,” *J. Control. Release*, vol. 133, no. 1, pp. 11–17, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.jconrel.2008.09.086.
- [39] T. Thambi *et al.*, “Hypoxia-responsive polymeric nanoparticles for tumor-targeted drug delivery,” *Biomaterials*, vol. 35, no. 5, pp. 1735–1743, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.022.
- [40] S. Parveen and S. K. Sahoo, “Polymeric nanoparticles for cancer therapy,” *J. Drug Target.*, vol. 16, no. 2, pp. 108–123, Jan. 2008, doi: 10.1080/10611860701794353.
- [41] C. I. C. Crucho and M. T. Barros, “Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 80, pp. 771–784, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.06.004.
- [42] H. Nsairat, D. Khater, U. Sayed, F. Odeh, A. Al Bawab, and W. Alshaer, “Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications,” *Heliyon*, vol. 8, no. 5, p. e09394, 2022, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09394.
- [43] B. C. Mohanta *et al.*, “Lipid Based Nanoparticles: Current Strategies for Brain Tumor Targeting,” *Curr. Nanomater.*, vol. 4, no. 2, pp. 84–100, Aug. 2019, doi: 10.2174/2405461504666190510121911.
- [44] P. S. Rajalakshmi, K. Eswar, P. Patra, and A. K. Rengan, “Nanomedicine for Cancer Therapy,” in *Nanobiotechnology*, Boca Raton: CRC Press, 2024, pp. 191–224. doi: 10.1201/9781003305583-9.
- [45] C. Paper and T. Salah, “Nanobiotechnology and its Agricultural Applications,” no. October, 2016.
- [46] H. Zare *et al.*, “Carbon Nanotubes: Smart Drug/Gene Delivery Carriers,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. Volume 16, pp. 1681–1706, Mar. 2021, doi: 10.2147/IJN.S299448.

- [47] Y. Hwang, S.-H. Park, and J. Lee, “Applications of Functionalized Carbon Nanotubes for the Therapy and Diagnosis of Cancer,” *Polymers (Basel)*, vol. 9, no. 1, p. 13, Jan. 2017, doi: 10.3390/polym9010013.
- [48] K. Chen *et al.*, “Stimuli-responsive electrospun nanofibers for drug delivery, cancer therapy, wound dressing, and tissue engineering,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 21, no. 1, p. 237, Jul. 2023, doi: 10.1186/s12951-023-01987-z.
- [49] R. Jain, S. Shetty, and K. S. Yadav, “Unfolding the electrospinning potential of biopolymers for preparation of nanofibers,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 57, no. January, p. 101604, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.jddst.2020.101604.
- [50] I. Kalashnikova, S. Das, and S. Seal, “Nanomaterials for Wound Healing: Scope and Advancement,” *Nanomedicine*, vol. 10, no. 16, pp. 2593–2612, Aug. 2015, doi: 10.2217/nmm.15.82.
- [51] N. Aminu *et al.*, “Applications of nanofibers drug delivery system in cancer therapy,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 90, no. October, p. 105128, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.jddst.2023.105128.
- [52] F. Mohammadian and A. Eatemadi, “Drug loading and delivery using nanofibers scaffolds,” *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*, vol. 45, no. 5, pp. 881–888, Jul. 2017, doi: 10.1080/21691401.2016.1185726.
- [53] S. F. Chou, D. Carson, and K. A. Woodrow, “Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers,” *J. Control. Release*, vol. 220, pp. 584–591, 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.09.008.
- [54] S. Y. Chew, J. Wen, E. K. F. Yim, and K. W. Leong, “Sustained Release of Proteins from Electrospun Biodegradable Fibers,” *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 4, pp. 2017–2024, Jul. 2005, doi: 10.1021/bm0501149.
- [55] N. Nayerossadat, T. Maedeh, and P. Ali, “Viral and nonviral delivery systems for gene delivery,” *Adv. Biomed. Res.*, vol. 1, no. 1, p. 27, 2012, doi: 10.4103/2277-9175.98152.
- [56] O. A. Mohamed, S. H. Masood, and J. L. Bhowmik, “Characterization and dynamic mechanical analysis of PC-ABS material processed by fused deposition

- modelling: An investigation through I-optimal response surface methodology,” *Measurement*, vol. 107, pp. 128–141, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.measurement.2017.05.019.
- [57] L. G. Bracaglia, B. T. Smith, E. Watson, N. Arumugasaamy, A. G. Mikos, and J. P. Fisher, “3D printing for the design and fabrication of polymer-based gradient scaffolds,” *Acta Biomater.*, vol. 56, pp. 3–13, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2017.03.030.
- [58] D. K. Tan, M. Maniruzzaman, and A. Nokhodchi, “Advanced Pharmaceutical Applications of Hot-Melt Extrusion Coupled with Fused Deposition Modelling (FDM) 3D Printing for Personalised Drug Delivery,” *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 4, p. 203, Oct. 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10040203.
- [59] S. J. Trenfield, C. M. Madla, A. W. Basit, and S. Gaisford, “The Shape of Things to Come: Emerging Applications of 3D Printing in Healthcare,” in *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series*, vol. 31, 2018, pp. 1–19. doi: 10.1007/978-3-319-90755-0_1.
- [60] P. Szymczyk-Ziółkowska, M. B. Łabowska, J. Detyna, I. Michalak, and P. Gruber, “A review of fabrication polymer scaffolds for biomedical applications using additive manufacturing techniques,” *Biocybern. Biomed. Eng.*, vol. 40, no. 2, pp. 624–638, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.bbe.2020.01.015.
- [61] S. Khalil and W. Sun, “Biopolymer deposition for freeform fabrication of hydrogel tissue constructs,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, no. 3, pp. 469–478, Apr. 2007, doi: 10.1016/j.msec.2006.05.023.
- [62] K. A. Deo, K. A. Singh, C. W. Peak, D. L. Alge, and A. K. Gaharwar, “Bioprinting 101: Design, Fabrication, and Evaluation of Cell-Laden 3D Bioprinted Scaffolds,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 26, no. 5–6, pp. 318–338, Mar. 2020, doi: 10.1089/ten.tea.2019.0298.
- [63] T. W. Ridky, J. M. Chow, D. J. Wong, and P. A. Khavari, “Invasive three-dimensional organotypic neoplasia from multiple normal human epithelia,” *Nat. Med.*, vol. 16, no. 12, pp. 1450–1455, Dec. 2010, doi: 10.1038/nm.2265.

- [64] T. Boland, T. Xu, B. Damon, and X. Cui, “Application of inkjet printing to tissue engineering,” *Biotechnol. J.*, vol. 1, no. 9, pp. 910–917, Sep. 2006, doi: 10.1002/biot.200600081.
- [65] F. Xu *et al.*, “A droplet-based building block approach for bladder smooth muscle cell (SMC) proliferation,” *Biofabrication*, vol. 2, no. 1, p. 014105, Mar. 2010, doi: 10.1088/1758-5082/2/1/014105.
- [66] V. Mironov, T. Boland, T. Trusk, G. Forgacs, and R. R. Markwald, “Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering,” *Trends Biotechnol.*, vol. 21, no. 4, pp. 157–161, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0167-7799(03)00033-7.
- [67] S. Tasoglu and U. Demirci, “Bioprinting for stem cell research,” *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 1, pp. 10–19, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.tibtech.2012.10.005.
- [68] Q. Hamid *et al.*, “Fabrication of three-dimensional scaffolds using precision extrusion deposition with an assisted cooling device,” *Biofabrication*, vol. 3, no. 3, p. 034109, Sep. 2011, doi: 10.1088/1758-5082/3/3/034109.
- [69] S. Tasoglu, C. H. Yu, H. I. Gungordu, S. Guven, T. Vural, and U. Demirci, “Guided and magnetic self-assembly of tunable magnetoceptive gels,” *Nat. Commun.*, vol. 5, no. 1, p. 4702, Sep. 2014, doi: 10.1038/ncomms5702.
- [70] S. Tasoglu, C. H. Yu, V. Liaudanskaya, S. Guven, C. Migliaresi, and U. Demirci, “Magnetic Levitational Assembly for Living Material Fabrication,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 4, no. 10, pp. 1469–1476, Jul. 2015, doi: 10.1002/adhm.201500092.
- [71] M. R. Junttila and F. J. de Sauvage, “Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response,” *Nature*, vol. 501, no. 7467, pp. 346–354, Sep. 2013, doi: 10.1038/nature12626.
- [72] S. Knowlton, S. Onal, C. H. Yu, J. J. Zhao, and S. Tasoglu, “Bioprinting for cancer research,” *Trends Biotechnol.*, vol. 33, no. 9, pp. 504–513, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.007.
- [73] E. Ilhan *et al.*, “The Role of Multilayer Electrospun Poly(Vinyl Alcohol)/Gelatin nanofibers loaded with Fluconazole and Cinnamaldehyde in the Potential

- Treatment of Fungal Keratitis,” *Eur. Polym. J.*, vol. 176, p. 111390, Aug. 2022, doi: 10.1016/J.EURPOLYMJ.2022.111390.
- [74] S. Cesur *et al.*, “Design of Cinnamaldehyde- and Gentamicin-Loaded Double-Layer Corneal Nanofiber Patches with Antibiofilm and Antimicrobial Effects,” *ACS Omega*, 2023, doi: 10.1021/acsomega.3c00914.
- [75] E. Mele, “Electrospinning of natural polymers for advanced wound care: towards responsive and adaptive dressings,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 28, pp. 4801–4812, 2016, doi: 10.1039/C6TB00804F.
- [76] S. Cesur *et al.*, “A Novel Strategy as a Potential Rapid Therapy Modality in the Treatment of Corneal Ulcers: Fluconazole/Vancomycin Dual Drug-Loaded Nanofibrous Patches,” *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 308, no. 5, 2023, doi: 10.1002/mame.202200697.
- [77] M. Koyun *et al.*, “Electrospun composite nanofibers for treating infectious esophagitis,” *Emergent Mater.*, no. 0123456789, Jul. 2023, doi: 10.1007/s42247-023-00533-9.
- [78] N. Salahuddin, E. M. Ibrahim, and M. El-Kemary, “Electrospun Composite Nanofibers Based on PLA/Artesunate-loaded Citrate-functionalized Hydroxyapatite for Boosting *in-vitro* Anticancer Efficacy and Drug Delivery of Artesunate,” *Fibers Polym.*, vol. 23, no. 12, pp. 3415–3426, 2022, doi: 10.1007/s12221-022-4017-3.
- [79] W. J. Choi *et al.*, “Rapid development of dual porous poly(lactic acid) foam using fused deposition modeling (FDM) 3D printing for medical scaffold application,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 110, no. September 2019, p. 110693, May 2020, doi: 10.1016/j.msec.2020.110693.
- [80] H. Y. Cakmak *et al.*, “3D printed StyraX Liquidus (*Liquidambar orientalis* Miller)-loaded poly (L-lactic acid)/chitosan based wound dressing material: Fabrication, characterization, and biocompatibility results,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 248, no. March, p. 125835, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125835.

- [81] E. Saylam *et al.*, “Levodopa-loaded 3d-printed poly (Lactic) acid/chitosan neural tissue scaffold as a promising drug delivery system for the treatment of parkinson’s disease,” *Appl. Sci.*, vol. 11, no. 22, 2021, doi: 10.3390/app112210727.
- [82] C. Chen *et al.*, “Poly(lactic acid) (PLA) based nanocomposites - A novel way of drug-releasing,” *Biomed. Mater.*, vol. 2, no. 4, pp. L1–L4, Dec. 2007, doi: 10.1088/1748-6041/2/4/L01.
- [83] H. Y. Chi *et al.*, “Fabrication of polylactic acid/paclitaxel nano fibers by electrospinning for cancer therapeutics,” *BMC Chem.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1186/s13065-020-00711-4.
- [84] A. Mahapatro and D. K. Singh, “Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 9, no. 1, p. 55, 2011, doi: 10.1186/1477-3155-9-55.
- [85] S. Cesur, “Combination techniques towards novel drug delivery systems manufacturing: 3D PCL scaffolds enriched with tetracycline-loaded PVP nanoparticles,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 194, no. July 2023, pp. 36–48, Jan. 2024, doi: 10.1016/j.ejpb.2023.11.022.
- [86] K. Nasouri, A. M. Shoushtari, and M. R. M. Mojtahedi, “Evaluation of effective electrospinning parameters controlling polyvinylpyrrolidone nanofibers surface morphology via response surface methodology,” *Fibers Polym.*, vol. 16, no. 9, pp. 1941–1954, 2015, doi: 10.1007/s12221-015-5263-4.
- [87] M. Pourmadadi, F. Yazdian, A. Koulivand, and E. Rahmani, “Green synthesized polyvinylpyrrolidone/titanium dioxide hydrogel nanocomposite modified with agarose macromolecules for sustained and pH-responsive release of anticancer drug,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 240, no. March, p. 124345, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124345.
- [88] T. Vongsetskul, T. Chantarodsakun, P. Wongsomboon, R. Rangkupan, and P. Tangboriboonrat, “Effect of Solvent and Processing Parameters on Electrospun Polyvinylpyrrolidone Ultra-fine Fibers,” *Chiang Mai J. Sci.*, vol. 42, pp. 436–442, Apr. 2015.

- [89] P. K. Vemula, N. R. Campbell, F. Zhao, B. Xu, G. John, and J. M. Karp, "Self-Assembled Prodrugs," in *Comprehensive Biomaterials*, P. Ducheyne, Ed. Oxford: Elsevier, 2011, pp. 339–355. doi: 10.1016/B978-0-08-055294-1.00135-5.
- [90] G. Kalaiyarasan, M. Veerapandian, G. JebaMercy, K. Balamurugan, and J. Joseph, "Amygdalin-Functionalized Carbon Quantum Dots for Probing β -Glucosidase Activity for Cancer Diagnosis and Therapeutics," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 5, no. 6, pp. 3089–3099, Jun. 2019, doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b00394.
- [91] A. M. Alwan, D. Rokaya, G. Kathayat, and J. T. Afshari, "Onco-immunity and therapeutic application of amygdalin: A review," *J. Oral Biol. Craniofacial Res.*, vol. 13, no. 2, pp. 155–163, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.jobcr.2022.12.010.
- [92] D. Figurová, K. Tokárová, H. Greifová, N. Knížatová, A. Kolesárová, and N. Lukáč, "Inflammation, It's Regulation and Antiphlogistic Effect of the Cyanogenic Glycoside Amygdalin," *Molecules*, vol. 26, no. 19, p. 5972, Oct. 2021, doi: 10.3390/molecules26195972.
- [93] R. Arpita, Tushita Attre, and Navneeta Bharadvaja, "Anticancer agent from medicinal plants: a review," *New aspects Med. plants Pharmacogn.*, vol. 1, no. 54, pp. 54–73, 2017.
- [94] E. Eroglu and S. N. Girgin, "A unique phenolic extraction method from olive oil macerate of *Hypericum perforatum* using DMSO: Assessment of *in-vitro* anticancer activity, LC-MS/MS profile, total phenolic content and antioxidant capacity," *South African J. Bot.*, vol. 139, pp. 6–11, 2021, doi: 10.1016/j.sajb.2021.01.015.
- [95] Y. Y. Yan, Q. Zhang, B. Zhang, B. Yang, and N. M. Lin, "Active ingredients of *Inula helenium* L. exhibits similar anti-cancer effects as isoalantolactone in pancreatic cancer cells," *Nat. Prod. Res.*, vol. 34, no. 17, pp. 2539–2544, 2020, doi: 10.1080/14786419.2018.1543676.
- [96] M.-K. J. Jaemoo Chun, Sang-Min Park, Minsung Lee, In Jin Ha, "The Sesquiterpene Lactone-Rich Fraction of *Inula helenium* L.," *Cancers (Basel)*,

2023.

- [97] A. Salazar-Gómez, J. C. Ontiveros-Rodríguez, S. S. Pablo-Pérez, M. E. Vargas-Díaz, and L. Garduño-Siciliano, “The potential role of sesquiterpene lactones isolated from medicinal plants in the treatment of the metabolic syndrome – A review,” *South African J. Bot.*, vol. 135, pp. 240–251, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.sajb.2020.08.020.
- [98] E. Ilhan, Z. Karahaliloglu, E. Kilicay, B. Hazer, and E. B. Denkbaz, “Potent bioactive bone cements impregnated with polystyrene-g-soybean oil-AgNPs for advanced bone tissue applications,” *Mater. Technol.*, vol. 35, no. 3, pp. 179–194, 2020, doi: 10.1080/10667857.2019.1661157.
- [99] E. Ilhan *et al.*, “Fabrication of tissue-engineered tympanic membrane patches using 3D-Printing technology,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 114, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.JMBBM.2020.104219.
- [100] R. Sridhar *et al.*, “Curcumin-and natural extract-loaded nanofibres for potential treatment of lung and breast cancer: *In-vitro* efficacy evaluation,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 25, no. 10, pp. 985–998, 2014, doi: 10.1080/09205063.2014.917039.
- [101] T. Fan and R. Daniels, “Preparation and Characterization of Electrospun Polylactic Acid (PLA) Fiber Loaded with Birch Bark Triterpene Extract for Wound Dressing,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 22, no. 6, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1208/s12249-021-02081-z.
- [102] S. Cesur *et al.*, “Production and characterization of elastomeric cardiac tissue-like patches for Myocardial Tissue Engineering,” *Polym. Test.*, vol. 90, no. June, p. 106613, 2020, doi: 10.1016/j.polymertesting.2020.106613.
- [103] A. M. Abdelghany, M. S. Mekhail, E. M. Abdelrazek, and M. M. Aboud, “Combined DFT/FTIR structural studies of monodispersed PVP/Gold and silver nano particles,” *J. Alloys Compd.*, vol. 646, pp. 326–332, 2015, doi: 10.1016/j.jallcom.2015.05.262.
- [104] R. Sohail and S. R. Abbas, “Evaluation of amygdalin-loaded alginate-chitosan

- nanoparticles as biocompatible drug delivery carriers for anticancerous efficacy,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 153, pp. 36–45, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.191.
- [105] E. Ahmadi, M. M. Farimani, and H. Rezadoost, “Optimization of inulin extraction from *Inula helenium* L. using response surface methodology followed by its MALDI-TOF and TLC-FLD based characterization,” *J. Med. Plants*, vol. 21, no. 82, pp. 43–55, 2022, doi: 10.52547/jmp.21.82.43.
- [106] M. E. Cam *et al.*, “A novel treatment strategy for preterm birth: Intra-vaginal progesterone-loaded fibrous patches,” *Int. J. Pharm.*, vol. 588, no. August, p. 119782, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119782.
- [107] Ö. Aybastier, “Efficacy of methanol-water extract of *Inula helenium* root against oxidative DNA damage,” *J. Tradit. Chinese Med.*, vol. 41, no. 2, pp. 293–300, 2021, doi: 10.19852/j.cnki.jtcm.20210209.008.
- [108] N. Petkova, I. Ivanov, R. Vrancheva, P. Denev, and A. Pavlov, “Ultrasound and microwave-assisted extraction of elecampane (*Inula helenium*) roots,” *Nat. Prod. Commun.*, vol. 12, no. 2, pp. 171–174, 2017, doi: 10.1177/1934578x1701200207.
- [109] A. Gökbulut, O. Özhan, B. Satilmis, K. Batçioğlu, S. Günal, and E. Şarer, “Antioxidant and antimicrobial activities, and phenolic compounds of selected inula species from Turkey,” *Nat. Prod. Commun.*, vol. 8, no. 4, pp. 475–478, 2013, doi: 10.1177/1934578x1300800417.
- [110] Z. Stojanović-Radić *et al.*, “Antistaphylococcal activity of *Inula helenium* L. root essential oil: Eudesmane sesquiterpene lactones induce cell membrane damage,” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 31, no. 6, pp. 1015–1025, 2012, doi: 10.1007/s10096-011-1400-1.
- [111] W. Cui, X. Li, S. Zhou, and J. Weng, “Degradation patterns and surface wettability of electrospun fibrous mats,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 93, no. 3, pp. 731–738, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.12.002.
- [112] R. Nirmala, H.-M. Park, R. Navamathavan, H.-S. Kang, M. H. El-Newehy, and H. Y. Kim, “Lecithin blended polyamide-6 high aspect ratio nanofiber scaffolds

- via electrospinning for human osteoblast cell culture,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, no. 2, pp. 486–493, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.msec.2010.11.013.
- [113] D. Wang *et al.*, “Development of Injectable Biodegradable Multi-Arms PEG-Based Hydrogels: Swelling and Degradation Investigations,” *Macromol. Symp.*, vol. 296, no. 1, pp. 233–237, Oct. 2010, doi: 10.1002/masy.201051033.
- [114] M. Hadianfar, D. Semnani, and J. Varshosaz, “Polycaprolactone/chitosan blend nanofibers loaded by 5-fluorouracil: An approach to anticancer drug delivery system,” *Polym. Adv. Technol.*, vol. 29, no. 12, pp. 2972–2981, Dec. 2018, doi: 10.1002/pat.4417.
- [115] J. P. Martins *et al.*, “3D printing: prospects and challenges,” in *Nanotechnologies in Preventive and Regenerative Medicine*, Elsevier, 2018, pp. 299–379. doi: 10.1016/B978-0-323-48063-5.00004-6.
- [116] E. Ilhan *et al.*, “Development of Satureja cuneifolia-loaded sodium alginate/polyethylene glycol scaffolds produced by 3D-printing technology as a diabetic wound dressing material,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 161, pp. 1040–1054, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.086.
- [117] N. F. Zaaba and M. Jaafar, “A review on degradation mechanisms of polylactic acid: Hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation,” *Polym. Eng. Sci.*, vol. 60, no. 9, pp. 2061–2075, 2020, doi: 10.1002/pen.25511.
- [118] H. M. Mousa, M. G. Ali, A. I. Rezk, E. A. Nasr, and K. H. Hussein, “Development of conductive polymeric nanofiber patches for cardiac tissue engineering application,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 139, no. 32, pp. 1–17, Aug. 2022, doi: 10.1002/app.52757.
- [119] S. A. Seyhan, D. B. Alkaya, S. Cesur, and A. Sahin, “Investigation of the antitumor effect on breast cancer cells of the electrospun amygdalin-loaded poly(l-lactic acid)/poly(ethylene glycol) nanofibers,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 239, p. 124201, Jun. 2023, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2023.124201.
- [120] S.-F. Chou, D. Carson, and K. A. Woodrow, “Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers,” *J. Control. Release*, vol. 220, no. 1,

- pp. 584–591, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.09.008.
- [121] G. Buschle-Diller, J. Cooper, Z. Xie, Y. Wu, J. Waldrup, and X. Ren, “Release of antibiotics from electrospun bicomponent fibers,” *Cellulose*, vol. 14, no. 6, pp. 553–562, Oct. 2007, doi: 10.1007/s10570-007-9183-3.
- [122] S. Sena *et al.*, “Controlled Release of Metformin Hydrochloride from Core-Shell Nanofibers with Fish Sarcoplasmic Protein,” *Medicina (B. Aires)*, vol. 55, no. 10, p. 682, Oct. 2019, doi: 10.3390/medicina55100682.
- [123] S. Cesur, “ANTIOXIDANT AND ANTI-TUMOUR ACTIVITIES OF INULA VISCOSA L EXTRACT-LOADED NANOFIBROUS MATS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS,” *Ceram. - Silikaty*, vol. 67, no. 4, pp. 411–419, Sep. 2023, doi: 10.13168/cs.2023.0041.
- [124] K. Kim, Y. Song, and H. Lim, “Amygdalin Extract from Armeniaca semen Induces Apoptosis in Human COLO 201 Colon Cancer Cells,” vol. 26, no. 4, 2005.
- [125] D. C. Dorn, M. Alexenizer, J. G. Hengstler, and A. Dorn, “Tumor cell specific toxicity of Inula helenium extracts,” *Phyther. Res.*, vol. 20, no. 11, pp. 970–980, Nov. 2006, doi: 10.1002/ptr.1991.
- [126] M. Leite, M. Quinta-Costa, P. S. Leite, and J. E. Guimarães, “Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death - Study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60,” *Anal. Cell. Pathol.*, vol. 19, no. 3–4, pp. 139–151, 1999, doi: 10.1155/1999/176515.

ÖZGEÇMİŞ

Rabia Betül SULUTAŞ

Eğitim Bilgileri

Yüksek Lisans: Marmara Üniversitesi – Fen Bilimleri Enstitüsü- Metalurji ve Malzeme Mühendisliği 2022 –

Lisans: Manisa Celal Bayar Üniversitesi – Mühendislik Fakültesi –Biyomühendislik 2015 - 2020

Projeler:

- TÜBİTAK İkili İşbirliği, Proje No:120N333, "Kornea perforasyonu kaynaklı ikincil kornea enfeksiyonlarının tedavisi için çok tabakalı yamaların tasarımı ve üretimi", 2021-2022, Bursiyer
- BAPKO, Proje No:11178, Marmara Üniversitesi, "Elektroegirme Yöntemi ile Kanser Tedavisine Yönelik Inula helenium ekstraktı ve Amigdalın Yüklü Nanofiberlerin Üretimi", 2023 (Yüksek Lisans Tezi)
- TÜBİTAK 1001 Proje No:123S088, “Üç Boyutlu Biyomimetik Kronik Yara Modellerinde Eksozom-Aracılı İlaç Taşıyıcı Sistem Kullanarak Yeni Bir Yara Tedavi Stratejisinin Geliştirilmesi
2022-2024, Bursiyer

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

Sulutas, R. B., Cesur, S., Seyhan, S. A., Alkaya, D. B., Sahin, A., Ekren, N., & Gunduz, O. (2024). Electrospun Amygdalin and Inula helenium Extract-loaded Polylactic acid (PLA)/Polyvinylpyrrolidone (PVP) Nanofibrous Patches for Colon Cancer Treatment: Fabrication, Characterization and Antitumour Effect Results. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 105940.

Koyun, M., **Sulutas, R. B.**, Turan, Y., Karabulut, H., Moradi, A., Ozarici, H. B., ... ULAĞ, S.(2023). Electrospun composite nanofibers for treating infectious esophagitis. *EMERGENT MATERIALS* , vol.6, 1549-1561.

Cesur S, Ilhan E, Pilavci E, **Sulutas RB**, et al. A Novel Strategy as a Potential Rapid Therapy Modality in the Treatment of Corneal Ulcers: Fluconazole/Vancomycin Dual Drug-Loaded Nanofibrous Patches. *Macromolecular Materials and Engineering*. 2023;308:1-17. doi:10.1002/mame.202200697

Ilhan E, Cesur S, **Sulutas RB**, et al. The Role of Multilayer Electrospun Poly(Vinyl Alcohol)/Gelatin nanofibers loaded with Fluconazole and Cinnamaldehyde in the Potential Treatment of Fungal Keratitis. *European Polymer Journal*. 2022;176:1-15. doi:10.1016/j.eurpolymj.2022.111390

Tasci ME, Dede B, Tabak E, Gur A, **Sulutas RB**, Cesur S, Ilhan E, Lin C-C, Paik P, Fikai D, et al. Production, Optimization and Characterization of Polylactic Acid Microparticles Using Electrospray with Porous Structure. *Applied Sciences*. 2021; 11(11):5090. <https://doi.org/10.3390/app11115090>

Uluslararası Bilimsel Konferanslarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında basılan Bildiriler:

Avcı A., Sayan M., **Sulutas RB.**, Calhan A., Cesur S., Gunduz O., Production of Nanofibers by Coaxial Electrospinning Method Using Bacterial Cellulose Synthesized Using Orange Peel Extract and PCL/PLA Composite Sözlü Sunum Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering NanoBioMat 2024 – Summer Edition, 19-21 Haziran 2022, Romanya.

Sulutas RB., Cesur S., Seyhan S., Alkaya D., Gunduz O., Inula-helenium extract-loaded Nanofibrous Patches for the treatment of Cancer Sözlü Sunum Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering NanoBioMat 2023 – Summer Edition, 28-30 Haziran 2023, Romanya.

Sulutas RB., Cesur S., Gunduz O., Three-Dimensional Polycaprolactone (PCL) Scaffold Combined with Tetracycline-loaded Electro spray Particle Sözlü Sunum Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering NanoBioMat 2022 – Summer Edition, 22-24 Haziran 2022, Romanya.

Sulutas RB., Cesur S., Ilhan E., Gunduz O., Production and Characterization of Drug-Loaded Tissue Healing Nanofiber Dressing for Corneal Ulcer Treatment Sözlü Sunum, Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering NanoBioMat 2022 – Winter Edition, 24-26 Kasım 2022, Romanya.