

T.C.

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

REJENERE SELÜLOZ ESASLI TAŞIYICI SİSTEMLERLE
İNSAN KANSER HÜCRELERİNDE APOPTOZ
İNDÜKSİYONU

ELİF YİĞİT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2024

MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

Elif YİĞİT tarafından hazırlanan Rejenere Selüloz Esaslı Taşıyıcı Sistemlerle İnsan Kanser Hücrelerinde Apoptoz İndüksiyonu başlıklı tezinin, 03/06/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Fatma AYHAN (**Jüri Başkanı**)
Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

Dr. Öğr. Üyesi Aydan GÜLSU (**Danışman**)
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU (**Üye**)
Kimya Anabilim Dalı,
Marmara Üniversitesi, İstanbul

İmza:

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Reşat ÜNAL
Moleküler Biyoloji ve Genetik (**Ana Bilim Dalı Başkanı**)
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

Dr. Öğr. Üyesi Aydan GÜLSU (**Danışman**)
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

Savunma Tarihi: 03/06/2024

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Elif YİĞİT

03/06/2024

ÖZET

Rejenere Selüloz Esaslı Taşıyıcı Sistemlerle İnsan Kanseri Hücrelerinde Apoptoz İndüksiyonu

Elif YİĞİT

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr.Üyesi Aydan GÜLSU

Haziran 2024, 52 Sayfa

Çok hücreli organizmalarda, hastalıkların önlenmesinde, doku ve organlarda uygun hücre sayısının devam etmesi, yani hücre sayısındaki denge önem arz etmektedir. Hücre sayısındaki anomaliler sonucu kanser, otoimmün, dejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalık ortaya çıkabilmektedir. Dokularda bu hassas dengenin sürdürülmesi amacıyla apoptoz sürecine müdahale edilmesi, hücre sayısındaki artış veya azalmaya bağlı olarak gelişen hastalıklar için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

Dünyadaki ölüm sebeplerinin başında yer alan, proliferasyon artışı ile karakterize edilen kanser hastalığının, apoptozda azalmaya bağlı olarak geliştiği bilinmektedir. Kanser tedavi yöntemlerinden biri olan kemoterapide, antikanserojen ajanlar tümör hücre DNA sentezi ve hücre bölünmesi sürecine etki ederek apoptoz indüksiyonuna neden olmaktadır.

Konvansiyonel ilaç salım sistemleri, uzun dönem tedavilerdeki bazı kısıtlayıcı sebeplerden dolayı günümüzde pek çok alanda yetersiz kalabilmektedir. Son yıllarda etken maddelerin aktivitesini istenilen oranda, istenen bölgeye lokalize etmeyi amaçlayan ve daha az yan etki ile artırılmış aktivite sergileyen kontrollü ilaç salım sistemleri giderek önem kazanmaktadır. Kontrollü ilaç salım sistemleri uygulamaları ile etken maddenin yarılanma ömrünün artması, daha düşük lenf drenaj ve daha yüksek kan dolaşımı süresi gibi avantajlar sağlanmaktadır. Bu amaçla farklı taşıyıcı sistemler ile çeşitli hastalıkların tedavisi için alternatif biyomalzemeler geliştirilebilmektedir. İlaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında biyomalzeme olarak çok çeşitli polimerler kullanılmaktadır. Bunlardan selüloz, doğal biyopolimerik malzemeler arasında çeşitli avantajları bakımından en çok tercih edilen biyopolimerlerdendir.

Çalışma kapsamında yüksek selüloz içeriğine sahip (%95-99) atık pamuktan selüloz esaslı taşıyıcı eldesi hedeflenmiştir. Atık pamuktan selüloz esaslı taşıyıcı elde edilerek değerlendirilmesinin, ülke ekonomisi ve atıkların çevreye olan olumsuz etkilerinin giderilmesi açısından önem arz etmektedir. Bu amaçla atık pamuk, ön işlemler (yıkama, öğütme) saflaştırma (hemiselüloz ve ligninin uzaklaştırılması) ve asit hidrolizi olmak üzere, çeşitli işlem basamaklarından geçirilerek selüloz esaslı

taşıyıcı elde edilmiştir. Elde edilen selüloz esaslı taşıyıcının boy/boy dağılımı SEM analizi, yapı analizi ise FTIR analiz yöntemi kullanılarak karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Daha sonra, selüloz esaslı taşıyıcıya apoptoz indüksiyonu için proteazomal inhibitörlerden biri olan ve enzimatik Neddilasyon kademesinin ilk adımını yöneten Nedd8 aktive edici enzimin (NAE) inhibitörü olan MLN4924'ün (Pevonedistat) yükleme çalışmalarına geçilmiştir. Bunun için, MLN4924'ün selüloz esaslı taşıyıcıya adsorbsiyonu yöntemi kullanılarak, yükleme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen MLN4924 yüklü selüloz esaslı taşıyıcının MTT testi, taşıyıcının sitotoksitesi ve etken madde yüklü selüloz esaslı taşıyıcının U87 (Glioblastoma) hücre hattı üzerinde etkinliği incelenmiştir. Ayrıca kristal viyole boyama yöntemi ve floresan mikroskobu ile görüntüleri alınmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre 0.7- 1.1 µm selüloz esaslı taşıyıcı eldesi başarı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen taşıyıcılara etken madde (MLN4924) %50 verim ile yüklenmiştir. Salım çalışmaları, MLN4924'ün kontrollü bir şekilde 38 saat sonunda selüloz esaslı taşıyıcıdan salımının tamamlandığını göstermiştir. Yapılan hücre canlılık testlerinde selüloz esaslı taşıyıcıya yüklenmesi ile apoptoz indüksiyonu %97 oranında başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Kristal viyole ve floresan mikroskobu ile alınan görüntüler ile sonuçlar desteklenmiştir.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, Selüloz, Kanser, Biyopolimer, MLN4924

ABSTRACT

Induction Of Apoptosis In Human Cancer Cells By Regenerated Cellulose-Based Carrier Systems

Elif YİĞİT

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Dr. Öğr. Ü. Aydan GÜLSU

June 2024, 52 Pages

In multicellular organisms, maintaining the appropriate number of cells in tissues and organs, i.e. the balance in cell number, is important for disease prevention. Anomalies in cell number can lead to many diseases such as cancer, autoimmune and degenerative diseases. Intervening in the apoptosis process to maintain this delicate balance in tissues enables the development of new treatment strategies for diseases that develop due to an increase or decrease in cell number.

It is known that cancer, which is one of the leading causes of death in the world and characterized by increased proliferation, develops due to a decrease in apoptosis. In chemotherapy, one of the cancer treatment methods, anticancer agents cause apoptosis induction by affecting tumor cell DNA synthesis and cell division process.

Conventional drug delivery systems may be inadequate in many fields today due to some limitations in long-term treatments. In recent years, controlled drug delivery systems, which aim to localize the activity of active substances to the desired site at the desired rate and exhibit increased activity with fewer side effects, have gained increasing importance. Controlled drug delivery systems provide advantages such as increased half-life of the active substance, lower lymph drainage and higher blood circulation time. For this purpose, alternative biomaterials can be developed for the treatment of various diseases with different carrier systems. A wide variety of polymers are used as biomaterials in the preparation of drug carrier systems. Among these, cellulose is one of the most preferred biopolymers in terms of its various advantages among natural biopolymeric materials.

Within the scope of the study, it was aimed to obtain cellulose-based carrier from waste cotton with high cellulose content (95-99%). In addition, it is important to obtain and utilize cellulose-based carriers from waste cotton in terms of national economy and eliminating the negative effects of wastes on the environment. For this purpose, cellulose-based carrier was obtained by passing the waste cotton through various process steps including pre-treatments (washing, milling) purification (removal of hemicellulose and lignin) and acid hydrolysis. The characterization

studies of the cellulose-based carrier were completed by using SEM analysis for length/length distribution and FTIR analysis for structure analysis. Then, the cellulose-based carrier was loaded with MLN4924 (Pevonedistat), an inhibitor of Nedd8 activating enzyme (NAE), which is one of the proteasomal inhibitors for apoptosis induction and manages the first step of the enzymatic Neddylation step. For this purpose, the adsorption of MLN4924 on cellulose-based carrier was used for the loading process. The cytotoxicity of the obtained MLN4924 loaded cellulose based carrier was examined by MTT test and the activity of the active substance loaded cellulose based carrier on U87 (Glioblastoma) cell line.

According to the results obtained, 0.7- 1.1 μm cellulose based carriers were successfully obtained. The active substance (MLN4924) was loaded onto the obtained carriers with 50% efficiency. Release studies showed that MLN4924 was released from the cellulose-based carrier in a controlled manner after 38 hours. In the cell viability tests, apoptosis induction was successfully achieved by 97% by loading on cellulose-based carrier. The results were supported by images taken with crystal violet and fluorescence microscopy.

Keywords: Apoptosis, Cellulose, Cancer, Biopolymer, MLN4924

ÖNSÖZ

Tezimin oluşması ve sonuçlanmasında emeğini ve zamanını harcamaktan kaçınmayan sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Aydan GÜLSU'ya

Tez çalışmamın her basamağında kıymetli bilgilerini paylaşan emeğini esirgemeyen sevgili hocalarım Prof. Dr. Fatma AYHAN ve Prof Dr. Hakan AYHAN'a,

Çalışmamda bana ışık tutan Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi bünyesindeki tüm hocalarıma,

Laboratuvar çalışma arkadaşlarım Sabiha DEMİRCİ CENGİZ, Şuheda TABARU, Fazilet Mısra ÖZDEMİR'e,

Hayatımın her anında benden desteklerini esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini her zaman hissettiğim değerli babam İbrahim YİĞİT'e, annem Hesna YİĞİT'e ve değerli kardeşlerim Zeynep Nur YİĞİT ve Emre YİĞİT'e

Her konuda desteğini hissettiğim sevgili arkadaşlarım Fatma GÜNDÜZ, Elif ÇELİKKOL, Berre AKGÜN, Övgü KARSLI'ya, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, 123Z133 no'lu proje TÜBİTAK 1002-B Acil Destek Programı tarafından desteklenmiştir. Destekleri için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri.....	4
2.1.1. Hız programlı ilaç taşıyıcı sistemler	5
2.1.2. Aktivasyon kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler	5
2.1.3. Geri besleme kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler	6
2.1.4. Spesifik dokuya hedefleme yapan ilaç taşıyıcı sistemler	6
2.2. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinin Avantaj ve Dezavantajları.....	6
2.3. Kanser (Hücre ve Kanser Tipi)	7
2.4. Apoptoz	11
2.5. Apoptoz Mekanizmaları.....	13
2.5.1. İntrinsik (iç) mitokondriyal yol	13
2.5.2. Ekstrinsik (dış) yol	14
2.6. Apoptoz Tayini.....	14
2.7. Apoptozun Gösterilmesinde Başlıca Kullanılan Temel Yöntemler.....	15
2.7.1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri	15
2.7.1.1 Işık mikroskopik teknikler	15
2.7.1.2. Floresan mikroskobu	17
2.7.1.3. Elektron mikroskobu yöntem	17
2.7.1.4. Faz kontrast mikroskobu ile görüntüleme	17
2.7.2. İmmunohistokimyasal Yöntemler	18
2.7.2.1. TUNEL yöntemi	18
2.7.2.2. Anneksin V yöntemi.....	18
2.7.1.3. M30 yöntemi	19
2.7.3. Biyokimyasal Yöntemler.....	20
2.7.3.1. Agaroz jel elektroforezi.....	20

2.7.3.2 Western blot yöntemi	20
2.7.3.3. Flow sitometri.....	20
2.7.4. İmmunolojik Yöntemler	21
2.7.4.1 ELISA.....	21
2.8. MLN4924'ün Hücre Yolaklarındaki Etkisi	21
2.9. Kullanılan Etken Madde ve Kullanım Amacı.....	24
2.10. Kontrollü Salım Çalışmalarında Kullanılan Taşıyıcı Çeşitleri	24
2.11. Selüloz.....	25
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	27
3.1. Rejenere Selüloz Eldesi.....	27
3.2. Selüloz Esaslı Taşıyıcı Eldesi	27
3.3.Selüloz Esaslı Taşıyıcının Sodyum Periyodat Oksidasyon Yöntemi İle Modifikasyonu ve Aldehit Grubu Tayini	28
3.4. Selüloz Esaslı Taşıyıcı Karakterizasyon Yöntemleri.....	28
3.4.1 SEM analiz yöntemi	28
3.4.2 FTIR analiz yöntemi.....	28
3.5. MLN4924 Yüklü Selüloz Esaslı Taşıyıcıların Eldesi	29
3.5.1. MLN4924 kalibrasyon grafiğinin hazırlanması	29
3.6. MLN4924'ün Selüloz Esaslı Taşıyıcıdan Salım Çalışmaları.....	30
3.7. Hücre Canlılık Testleri.....	30
3.7.1. MTT Testi.....	31
3.7.2. Kristal viyole boyama ile hücre canlılığı tayini	32
3.7.3. Floresan mikroskobu ile apoptoz tayini	32
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	33
4.1. Rejenere Selüloz Eldesi.....	33
4.2. Selüloz Esaslı Taşıyıcı Eldesi	34
4.3. Selüloz Esaslı Taşıyıcının Sodyum Periyodat Oksidasyonu ile Modifikasyonu ve Aldehit Grup Tayini	36
4.4. Selüloz Esaslı Taşıyıcının Karakterizasyonu	36
4.4.1. SEM analizi.....	36
4.4.2. FTIR analizi	37
4.5. MLN4924 Yüklü Selüloz Esaslı Taşıyıcıların Eldesi	38
4.5.1. MLN4924'ün kalibrasyon grafiğinin hazırlanması	39
4.6. MLN4924'ün kontrollü salım çalışmaları.....	39
4.7. Hücre Canlılık Testleri.....	41
4.7.1. MTT testi.....	41

4.7.2.Kristal viyole boyama	42
4.7.3.Florasan mikroskobu ile apoptoz tayini	43
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ.....	51



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kanserin Ayırt Edici Özellikleri (Hanahan Ve Weinberg 2011).....	7
Şekil 2. Nf – Kb Sinyal Yolağının Kanserdeki Rollerini.....	9
Şekil 3. Tgf-B Sinyal Yolunun Şematik Gösterimi.. ..	10
Şekil 4. Apoptozda Rol Oynayan Yollar	12
Şekil 5. İntrinsik (İç) Ve Extrinsik (Dış) Apoptoz Yolları	13
Şekil 6. Hematoksilen-Eosin Boyama İle Trichoblastoma Hücrelerinin Görüntüsü	16
Şekil 7. Apoptozun Floresan Mikroskopu Görüntüleri.	17
Şekil 8. Tunel Testi İle Dnaz İle Muamele Edilmiş Doku Kesitinde Dna İpliği Kırılmaları Ve Apoptozun Gösterilmesi	18
Şekil 9. Pankreas Kanseri Dokusunda Apoptozun M30 İmmünohistokimya Yöntemi İle Belirlenmesi	19
Şekil 10. Mln4924'ün Etki Mekanizması	21
Şekil 11. Neddilasyon Kademesindeki Ana Proteinlerin Şematik Gösterimi.....	22
Şekil 12. Selüloz B-D Glukoz Polimeri.....	25
Şekil 13. Atık Pamuk	33
Şekil 14. Rejenere Selüloz.....	34
Şekil 15. Selüloz Esaslı Taşıyıcıya Ait İnverted Mikroskop Görüntüleri	34
Şekil 16. Selüloz Esaslı Taşıyıcıların Yüzde Boy Dağılım Grafiği.....	35
Şekil 17. Selüloz Esaslı Taşıyıcıya Ait Sem Görüntüsü	37
Şekil 18. Elde Edilen Selüloz Esaslı Taşıyıcıların Sodyum Periyodat Oksidasyonu Sonrası Ftr Grafiği	38
Şekil 19. Mln4924'ün Kalibrasyon Grafiği	39
Şekil 20. % Kümülatif Mln4924 Salım Grafiği.....	40
Şekil 21. 24 Ve 48 Saat Sonunda Mln4924'ün Apoptotik Etkisinin Mtt Testi Grafiği.....	42
Şekil 22. Mln4924 Yüklü Selüloz Esaslı Taşıyıcıların Hücre Uygulamasının Kristal Viyole Boyama İle Boyama Sonrası Alınan Görüntüleri A) 0,01mg/MI Derişiminde Mln4924 Uygulanan Hücreler B) Mln4924 Yüklü Selüloz Esaslı Taşıyıcı Uygulanan Hücreler C) Kontrol Grubu Hücreleri	43
Şekil 23. Mln4924 Yüklü Selüloz Esaslı Taşıyıcıların Hücre Uygulamasının Floresan Mikroskopu Görüntüleri A) 0,01mg/MI Derişiminde Mln4924 Uygulanan Hücreler B) Mln4924 Yüklü Selüloz Esaslı Taşıyıcı Uygulanan Hücreler C) Kontrol Grubu Hücreleri	44

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MLN4924	Pevonedistat
NAE	Nedd8 Aktive Edici Enzim
DNA	Deoksiribonükleik asit
GBM	Glioblastoma Multiform
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri
CRL	Culling-RİNG Ligaz
HBC12	Nedd8 Konjuge Edici Enzim
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
HER2	Ribonükleaz
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
M	Molar
cm	Santimetre
MTT	(3- (4,5-Dimetiltiyazol-2-İl) -2-5-Difeniltetrazolyum Bromür
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
NaIO ₄	Sodyum Periydat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
SEM	Scanning Electron Microscope
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi

1.GİRİŞ

Geleneksel ilaç tedavi yöntemlerinde, etken maddenin öngörülemeyen bir şekilde ani olarak salınması bu yöntemlerin dezavantajlarından birisidir. Bu yöntemlerdeki ilaç uygulamalarında ilaç, kısa zamanda maksimum plazma konsantrasyon düzeyine ulaşmakta, daha sonra ise ilacın plazma konsantrasyonu hızla düşmeye başlamaktadır. Bunların sonucunda, ilaç uygulamasının sağlıklı hücreler için toksik etkisi söz konusu olabilmektedir. Son yıllarda, öngörülebilir dozlama ile tedavi başarısını artırmak amacı ile geliştirilen bir kontrollü ilaç salım sistemleri ile ilgili araştırmalar dikkat çekmektedir. Bu sistemler ile istenilen ilacın istenilen dozda ve aralıkta, istenilen etkiyi oluşturabilmesi için etki yerine ulaşması, tek uygulamada ilacın kanda etkin bir şekilde uzun sağlanması gibi avantajlara sahiptir. Bu yöntemle düzenli bir dozlama aralığı sonucunda, ilacın, uygulaması sırasında sürekli olarak terapötik aralıkta kalması sağlanabilmektedir. Kontrollü salım sistemlerinde, doğal veya sentetik yapılardan hazırlanan taşıyıcı sistemlere etken maddenin yüklenmesi sonucu geleneksel ilaç tedavi yöntemlerinde karşılaşılan birçok dezavantajın önüne geçilebilmektedir. Özellikle sitotoksik etkisi yüksek olan antikanser ajanların taşıyıcı salım sistemlere bağlanması/yüklenmesi ile sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkisini azaltmada, avantaj sağlamaktadır. Böylece vücut için sitotoksik etki azaltılarak ilacın etki süresi ve etki oranı artırılabilir. Ayrıca çoklu ilaç direncinin önüne geçmede kontrollü ilaç salım sisteminin büyük avantaj sağladığı bilinmektedir. Kontrollü salım sistemleri; gelişmiş etkinlik, enkapsüle veya immobilize edilmiş bileşenlerin enzimatik-enzimatik olmayan, fiziksel, kimyasal değişimlerine ve degradasyonuna karşı yüksek stabiliteye sahip olması, gibi avantajlara sahiptirler.

Kontrollü ilaç salım uygulamalarında, taşıyıcı olarak farklı biyopolimerik malzemeler kullanılmaktadır. Selüloz, doğada en çok bulunması ve birçok avantaja sahip olması

nedeniyle en çok tercih edilen biyopolimerlerin başında gelmektedir. Tekstil üretiminde ortaya çıkan, çevre kirliliğine ve değerli kaynakların israfına neden olan atık pamuk, %95-99 oranında selüloz içermektedir. Selüloz, polisakkarit esaslı doğal bir polimerdir. Atık pamuğun geri dönüşümü ile, selüloz hammadde kaynağı olarak kullanımı, ekonomik ve çevresel nedenler sebebiyle önem arz etmektedir. Hücrede embriyogenez, proliferasyon, büyüme farklılaşma gibi yaşamsal olaylar için hücre içi ve hücreler arası sinyal iletimi oldukça önemlidir Sinyal iletimi düzenli olmayan hücreler, apoptoza giderek yok edilir. Temelinde hücrenin yaşaması, büyümesi ve ölümü gibi olayları etkileyen mutasyonların bir araya gelmesi karsinogenezi tetiklemektedir.

Apoptoz embriyonik gelişim ve çok hücreli organizmalarda homeostazın sürdürülmesini sağlayan bir süreçtir. Kontrollü ve enerji gerektiren apoptoz, programlanmış hücre ölümüdür. Bu süreçteki anomaliler sonucu kanser, otoimmün ve dejeneratif hastalıklar ortaya çıkabilmektedir. Kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün indüklenmesi, kanserin önlenmesi ve ilerlemesinin önüne geçilmesi bakımından önemli bir rol oynamaktadır. Kanser hücre proliferasyonunda artış ve apoptoza direnç sonucu geliştiği bilinmektedir. Hasarlı hücre ölümü inhibe olduğunda birikme ve dokuda çeşitli hasarlara sebep olmaktadır. Birçok antikanser ilaç, bu hücrelerde DNA sentezi ve hücre bölünmesine etki ederek apoptoz indüksiyonunu sağlamaktadır. Kanser hücrelerinin apoptoza duyarlı hale getirilmesi için antikanser ilaç tedavisinin etkili bir yol olduğu düşünülmektedir. Proteazomal inhibitörlerden biri olan MLN4924 (Pevonedistat), enzimatik Neddilasyon kademesinin ilk adımını yöneten Nedd8 aktive edici enzimin (NAE) inhibitörü olan potansiyel antineoplastik aktiviteye sahip bir moleküldür.

Çalışmada apoptoz indükleyici ajanın, atık pamuktan elde edilen selüloz gibi doğal biyopolimerik bir taşıyıcıya yüklenmesi, çalışmanın özgünlüğünü oluşturmaktadır. Bu çalışmada pamuk teleflerinden yıkama, öğütme gibi ön işlem uygulamalarının ardından, atık (telef) pamuk, asit ve alkali ile muamele edilerek uygun boyutta selüloz kristalleri ile taşıyıcı eldesi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra apoptoz mekanizmaları hedef alınarak, kanser hücrelerinde apoptozu indükleyen ajanlardan

biri olan MLN4924'ün doğal biyobozunur bir polimer olan selüloz esaslı taşıyıcıya yüklenmesi ile çalışmanın etkin bir şekilde uygulaması gerçekleştirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

Konvansiyonel (geleneksel) ilaç sistemleri, etken maddeyi ani olarak salan sistemlerdir. Bu ilaç sistemlerinde kanda, kısa zamanda ilacın maksimum plazma konsantrasyon düzeyine ulaşılır, sonra ilacın plazma konsantrasyonu hızla düşmeye başlar. Bu sistemlerin dezavantajlarından biri olan, ilacın yeterli miktarın altına düşmesi ve sağlıklı hücreler için toksik etkisi söz konusudur. Son yıllarda ilaç kullanımında günde birden fazla dozlama yapılan tedavi yöntemleri için tedavi başarısını artırmak amacı ile geliştirilen bir yöntem olan kontrollü ilaç salım sistemleri ile ilgili araştırmalar dikkat çekmektedir.

Konvansiyonel ilaç kullanımında ortaya çıkan problemleri en aza indirmek için yeni arayışlar, bilim insanlarını kontrollü ilaç salım sistemleri çalışmalarında taşıyıcı sistem geliştirilmesi çalışmalarına yönlendirmiştir. Kontrollü salım sisteminin genel tasarım amacı, uzun bir süre boyunca sabit sıfır dereceli ilaç salımı gerçekleştirmektir. Böylelikle ilacın kan seviyelerinde daha az dalgalanmaya sebep olur (Heng 2018).

Kontrollü salım sistemlerinde taşıyıcı olarak doğal ya da sentetik polimerik moleküller kullanılarak farklı özelliklerde farklı taşıyıcı sistemler hazırlanabilmektedir. Etken madde salımı için kullanılan taşıyıcının özellikleri oldukça önemlidir. Bu taşıyıcıların doğal ya da sentetik polimerik moleküller kullanılarak farklı özelliklerde farklı taşıyıcı sistemler hazırlanabilmektedir. Polimerik esaslı taşıyıcıların ilaç salımını kontrol etme, molekülleri belirli bir dokuya taşıma, ilaçları koruma ve ilacın biyoyararlanımını arttırma gibi bazı özelliklerinden dolayı çeşitli uygulamalar için kullanılmaktadır. Bu sistemlerin tasarımında, polimerlerin biyoyumlu, biyobozunur, toksik olmaması gibi özellikleri bulundurması gerekmektedir. Kontrollü salım sistemlerinde ilacın salım hızı ve etkinliği taşıyıcı: ilaç oranı, taşıyıcı boyutu ve şekli, ilacın fonksiyonel gruplarının taşıyıcı ile etkileşimi gibi özelliklere bağlı olduğundan genel bir salım profili

sağlamak zordur. Polimerlerin moleküler ağırlık, kristallik ve hidrofilik olma özelliklerine dikkat edilmelidir. Aktif bileşen olarak en çok kullanılan ilaç olduğundan, ilaca bağlı olan faktörler ise ilacın çözünürlüğü, moleküler ağırlıktaki polimer-ilac etkileşimleri gibi özelliklerdir.

Etken maddelerin çoğunun zayıf çözünürlükleri, yüksek toksisiteleri, yüksek dozajlarda kullanılmaları, vücutta spesifik olmayan dağılımları, ve kısa yarı ömürleri tedavide kullanımlarını sınırlandırır. Buna karşılık günümüzde, çeşitli disiplinlerden araştırmacıların, ilaçların sorunlarının azaltılmasına yardımcı olmak için bir araya gelmesiyle, ilaç taşıma sistemleri hızla gelişmektedir.

İlaçların farmakokinetik parametrelerinin ve farmakodinamik özelliklerinin kontrol edilmesi, diğer faydaların yanı sıra hasta uyumunun artmasına, yan etkilerin ve maliyetlerin azalması için faydalı bir yöntem olduğu bilinmektedir.

Kontrollü ilaç salım sistemleri 4 başlık altında incelenir (Tüylek 2017).

2.1.1. Hız programlı ilaç taşıyıcı sistemler

Bu sistemlerde etkin madde moleküllerinin salımı taşıyıcı sistemlerde önceden programlanarak etkin molekülün ilaç taşıyıcı sistem içinde veya dışında salımı difüzyon ile kontrol edilir. Polimer matris difüzyon sistemler, polimer membran geçiş kontrollü taşıyıcı sistemler, kontrollü ilaç taşıma sistemleri örnek olarak verilebilir.

2.1.2. Aktivasyon kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler

Aktivasyon kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerde etken madde salımı fiziksel, kimyasal etmenler ile enerji verilerek hızlı şekilde aktive edilir. Bu etmenlerin veya verilen enerjinin düzenlenmesi ile salım hızı kontrol edilir.

2.1.3. Geri besleme kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler

Bu ilaç taşıyıcı sistemde etken maddenin salınması ile geri besleme mekanizması sayesinde tetikleyici ajan olarak aktive edilir. Etken maddenin salım hızı, sisteme yerleştirilen sensör tarafından ajanın konsantrasyonu belirlenerek sağlanır. Böylelikle tetikleyici ajan sayesinde ilaç taşıyıcı sistem şişme, degradasyon veya salım gösterir.

2.1.4. Spesifik dokuya hedefleme yapan ilaç taşıyıcı sistemler

Spesifik ilaç taşıyıcı sistemler sayesinde biyoaktif ajanların kimyasal reaksiyonda belli hızda belli bir yapıya spesifik olacak şekilde salınması ile gerçekleştirilir. Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler ilaçları daha etkili ve nispeten daha pratik olarak hedefe iletilmesini sağlar (Tüylek, 2017).

2.2. Kontrollü ilaç salım sistemlerinin avantaj ve dezavantajları

Kontrollü salım sistemleri, emilim bölgesinde uniform konsantrasyonda ilaç bulunmasına olanak sağlayabilmektedir (Özçelik vd., 2022). Böylelikle ilacın yan etkileri en aza indirgenebilir. Ayrıca ilacın uygulama sıklığı da azaltılmış olur. Kontrollü ilaç salım sistemleri, istenilen ilacın istenilen dozda ve aralıkta, istenilen etkiyi oluşturabilmesi için etki yerine ulaşması, tek uygulamada ilacın kanda etkin bir şekilde uzun sağlanması gibi avantajları ile dikkat çekmektedir. Kontrollü salım sistemleri; enkapsüle veya immobilize edilmiş bileşenlerin enzimatik-enzimatik olmayan, fiziksel, kimyasal değişimlerine ve degradasyonuna karşı yüksek stabiliteye sahip olması, gibi avantajlara sahiptirler. Bu sistemler ile düzenli bir dozlama aralığı sonucunda, ilacın, uygulaması sırasında, sürekli olarak terapötik aralıkta kalması sağlanabilmektedir (Srikanth vd., 2013).

Kontrollü ilaç salım sistemleri hızlıca konvansiyonel sistemlerle karşılaştırıldığında kronik hastalıkların tedavisinde yüksek etkinlik, basitleştirilmiş dozlama aralığı ile yan etkilerin en aza indirgenmesi gibi pek çok fayda sağlarlar.

Gelişimlerdeki ilerlemelere rağmen kontrollü salım sistemler biyolojik sistemlerin dinamik davranışına bazen duyarlı olamayabilmektedir. Örneğin etken maddelerin serbest bırakılmasını sadece matrisle kontrol eden sistemler, hasta ihtiyaçlarına veya değişen fizyolojik durumlara bakmaksızın önceden belirlenmiş bir oranda yüklerini serbest bırakırlar. Tüm bunlara rağmen, kontrollü salım artık daha olgunlaşmış ve tıbbın birçok alanında (kanser, ağrı, diyabet, iskemi, miyokardiyal tedaviler) önemli uygulamalarda yerini bulmuştur (Özçelik vd., 2022).

2.3. Kanser (Hücre ve Kanser Tipi)



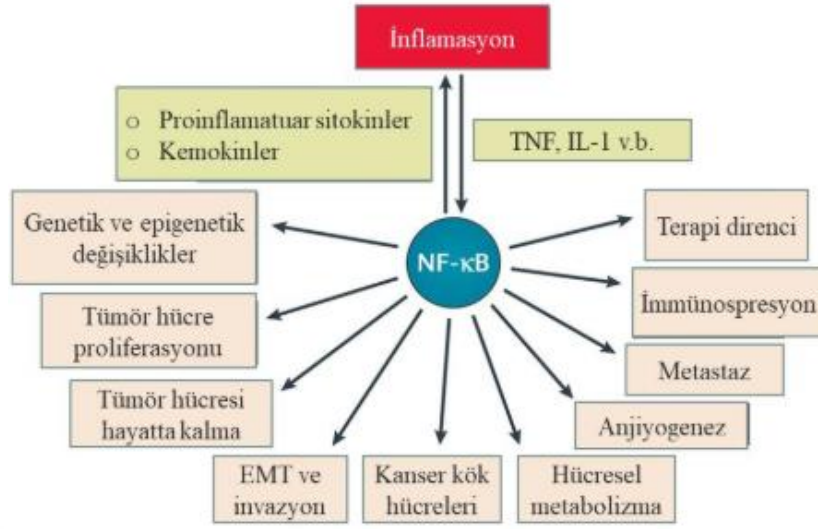
Şekil 1. Kanserin Ayırt Edici Özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011)

Hücrede embriyogenez, proliferasyon, büyüme farklılaşma gibi yaşamsal olaylar için hücre içi ve hücreler arası sinyal iletimi oldukça önemlidir. Hücreye gelen sinyaller her bir hücrede hücre içine iletilerek uygun yanıtlar oluşturulur. Sinyal iletimi düzenli olmayan hücreler, apoptoza giderek yok edilir. Temelinde hücrenin yaşaması, büyümesi ve ölümü gibi olayları etkileyen mutasyonların bir araya gelmesi karsinogenezi tetikler. Bu nedenle kanserlerde ilk etkilenen mekanizmalar hücrenin

sinyal iletim yolları olmakta ve bu sorun başta kanser olmak üzere birçok farklı hastalık oluşmasına öncülük etmektedir.

Literatürde kanser hücrelerinin, hücre proliferasyonunda artış ve apoptoza direnç sonucu geliştiği bildirilmektedir (Kaya, 2012). Kanser tedavisinde, hücrelerin apoptotik hücre ölümünün indüklenmesi, kanserin önlenmesi ve ilerlemesinin önüne geçilmesi bakımından önemli bir rol oynamaktadır. Farklı kanser oluşum mekanizmalarına etki edebilen anti-kanser ilaçlar, kanser hücrelerinde DNA sentezi ve hücre bölünmesine etki ederek apoptoz indüksiyonunu sağlamaktadır (Xu vd., 2016). Kanser hücrelerinin apoptoza duyarlı hale getirilmesinde antikanser ilaç tedavileri, etkin yolların başında gelmektedir. Son yıllarda bu konularda apoptotik hücre ölümünü indüklemenin, hedefe yönelik tedavilerde kanserin önlenmesi ve ilerlemesinin önüne geçilmesi konusunda, önemli çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Bir tümör hücresinin metastaz yapması genellikle yayılım, invazyon, intravasasyon, dolaşım, ekstrasvazasyon ve yeniden kolonizasyonu içeren bir süreçtir. Bu basamaklardan herhangi birinin tamamlanmaması, süreci durduracaktır. Metastaz, tümör hücreleri, kan akımı veya lenfatik damarlar yoluyla uzak organlara yayılması ile gerçekleşir. Tümör hücreleri, organ parankimine geçmeden, çoğalmadan ve organ içinde anjiyogenezi teşvik etmeden önce, hücre döngüsü durdurulmasına uğrar ve hedef organ içindeki kılcal yataklara yapışır. Tümör hücreleri bu adımları tamamlamayı başarır, işlem ikincil metastaz üretmek için tekrar edilebilir (Fares ve vd., 2020; Scully vd, 2012).

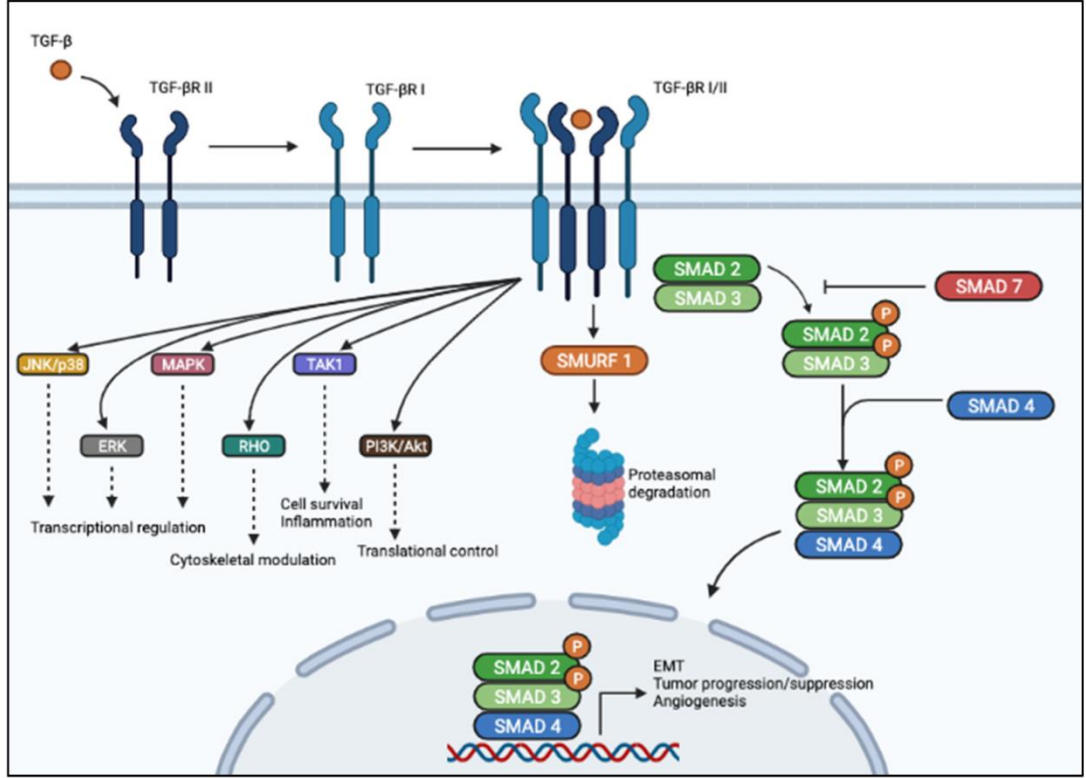


Şekil 2. NF – Kb Sinyal Yolağının Kanserdeki Roller (Fejzullahu 2021).

Glioblastoma multiforme (GBM), primer beyin tümörünün en yaygın ve agresif türüdür. Standart tedavi stratejileri genellikle yetersiz kalır. Modern tedavi uygulanmasına rağmen, GBM'li hastaların ortalama hayatta kalma süresi 14 aydır (Bryukhovetskiy ve Shevchenko 2016). Geç tanı, spesifik tanısal belirteçlerin eksikliği, geleneksel tedaviye gösterilen direnç ve tümör hücrelerinin yüksek proliferasyonu ve metastatik potansiyeli tedavisinin başarısız olmasına sebep olur.

Bu hastalar için tedavide cerrahi, önemli dozlarda kemoterapi ve radyasyon tercih edilen tedavi yöntemidir. İlaç direnci ve radyasyon, kemoterapi ve cerrahi prosedürlerden kaynaklanan kardiyotoksisite gibi çok sayıda toksik yan etki nedeni ile tedavi sınırlıdır. Hastaların hayatta kalma oranları hala düşük olup, alternatif tedavi yaklaşımları geliştirilmelidir.

Tümör hücrelerinin istilas ve infiltrasyonunun yanı sıra son derece yüksek proliferasyon oranı, GBM'li hastalarda mortaliteye önemli katkılarda bulunur (Westphal vd., 2011). Son zamanlarda glioma ile ilişkili sinyal yollarının araştırılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir. GBM onkogenezinin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması hastalığın tedavisinde yeni ve daha etkili yöntemlerin geliştirilmesine yardımcı olabilir.



Şekil 3. TGF-β Sinyal Yolunun Şematik Gösterimi (Sabbadini vd. 2021).

Glioma ile ilişkili çeşitli sinyal yollarından biri olan, transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β) sinyali, bu tümörlerin davranışını düzenler. Malign gliomalı hastaların kan serumunda ve tümör dokusunda TGF-β düzeylerinin yüksek olduğu ve bu düzeyin malignite tipi, tümörün gelişim evresi ve hastanın prognozu ile ilgili olduğu bilinmektedir (Platten, M. vd., 2001). TGF-β, fetal gelişim ve doku homeostazisi de dahil olmak üzere bir çok biyolojik sürecin düzenlenmesinde rol oynar (Seoane, 2006).

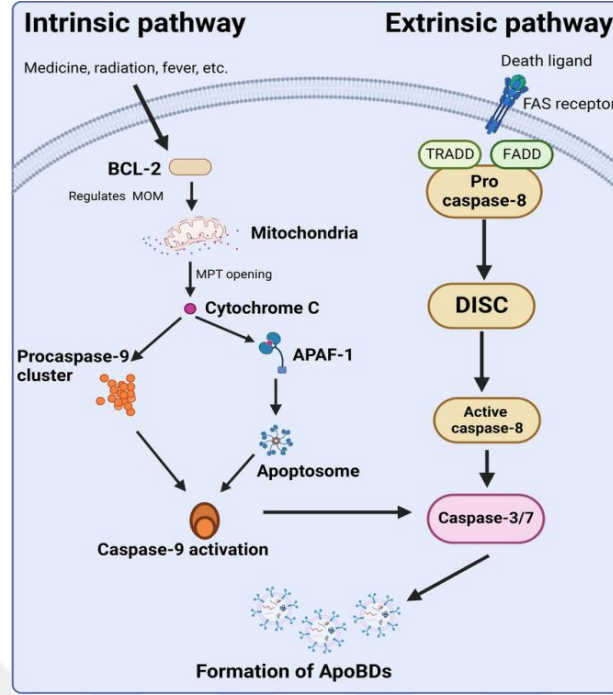
Moleküler düzeyde TGF-β; çoğalma, hayatta kalma, farklılaşma, göç ve bağışıklık aktivasyonu dahil olmak üzere çok sayıda hücresel süreçte rol oynar (Seoane, 2006). TGF-β, gelen sinyalleri ileten çeşitli ligandlar ve reseptörlerden oluşan karmaşık bir ağ aracılığıyla gerçekleştirir (Seoane, 2006). Ayrıca TGF-β sinyal yolu, kanserde tümör baskılayıcı ve onkogenik işlev gösterir (Massagué 2008). TGF-β, epitel hücrelerinin, astrositlerin ve immünositlerin inhibe ettiği için bir tümör baskılayıcı olarak kabul edilir (Platten, vd. 2001).

NF- κ B Sinyal Yolağı B hücrelerine özgü transkripsiyon faktörüdür. Çeşitli homodimerler ve heterodimerler oluşturan beş farklı DNA bağlayıcı proteinden oluşur. NF- κ B proteinleri, hücre proliferasyonunu hızlandırabilir, apoptozu inhibe edebilir, ve anjiyogenez ve metastazı uyarabilir. NF- κ B'nin aktivasyonu, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, nekrotik hücre ürünleri, DNA hasarı, oksidatif stres ve proinflamatuvar sitokinler tarafından hızlı ve geçici olarak indüklenir (Fejzullahu 2021). Kötü huylu hücrelerde ve tümör mikro ortamında birçok kanser türünde, NF - κ B yapısal olarak aktiftir.

NF- κ B ve kanser gelişimi NF- κ B'nin anormal ekspresyonu, glioblastoma dahil olmak üzere çok sayıda kanser türünün gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Biswas vd., 2004; Bradford ve Baldwin 2014). Bu bağlantı ilk olarak inflamasyon ve karsinogenez arasındaki ilişki ile gösterilmiştir. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre NF- κ B ve inflamasyonun arasındaki ilişki kansere yatkınlığı göstermiştir. Tümör mikro-çevre hücrelerinde inflamasyon ile indüklenen NF- κ B aktivasyonu, TNF α gibi bir dizi sitokin üretimine aracılık ederek tümör hücresi gelişimini destekleyen gen ekspresyonunu indükleyen malignan hücrelerde NF- κ B'yi uyarır. NF- κ B ile aktive edilmiş mikroçevre hücreleri tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu premalign hücrelerde DNA hasarı NF- κ B 34 aktivitesini daha da artırabilir (Taniguchi ve Karin 2018). Kanserde NF- κ B sinyalinin inhibe edilmesi ve kanser ilerlemesini tedavi etmek için NF- κ B inhibitörlerinin kullanılması, çeşitli kanser tiplerindeki uygulanması önemli bir araçtır.

2.4. Apoptoz

Apoptoz embriyonik gelişim ve çok hücreli organizmalarda homeostazın sürdürülmesini sağlayan bir süreçtir. Kontrollü ve enerji gerektiren apoptoz, programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanabilir. Tek ve çok hücreli organizmalarda hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması için oldukça önemlidir. Bu süreçteki anomaliler sonucu kanser, otoimmün ve dejeneratif hastalıklar ortaya çıkabilmektedir (Burz vd. 2009).



Şekil 4. Apoptozda Rol Oynayan Yollar (Yu vd. 2023)

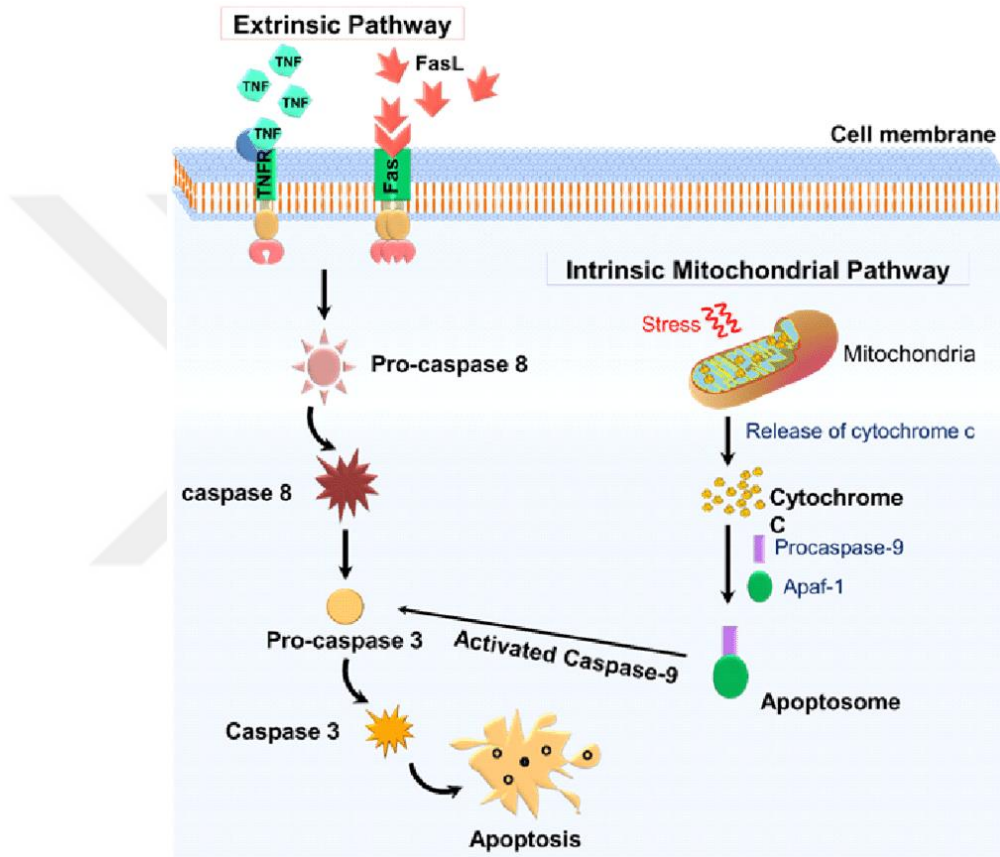
Kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün indüklenmesi, kanserin önlenmesi ve ilerlemesinin önüne geçilmesi bakımından önemli bir rol oynamaktadır. Kanser hücre proliferasyonunda artış ve apoptoza direnç sonucu geliştiği bilinmektedir (Kaya 2012). Hasarlı hücre ölümü inhibe olduğunda birikme ve dokuda çeşitli hasarlara sebep olmaktadır.

Apoptozis biyolojik görevlerini tamamlayan yapısal moleküllerin ya da DNA'sı hasar görmüş hücrelerin, ortadan kaldırılmasını sağlayan programlı hücre ölümüdür. Gerçekleşmesi için enerjiye ihtiyaç duyar. Embriyonik dönemden başlayarak tüm yaşam boyunca deri, gastrointestinal ve immün sistem gibi pek çok sisteme ait dokuların devamlılığı mitoz, hücre ölümü ve apoptozis arasındaki denge ile sağlanmaktadır (Dinçel ve Kul 2016). Organizmada, yaşam boyunca değişen derecelerde dejenerasyon ve nekroz gerçekleşir. Apoptozis ve mitoz arasındaki hassas ilişki ile bu denge sağlanır. Apoptozis de kendi içerisinde bir denge halindedir. Artması durumunda nörodejeneratif hastalıklara, azalması durumunda ise kanser ve fazla otoreaktif hücrelerin ortadan kaldırılamaması sonucu otoimmün hastalıklara yol açabilmektedir (Gewies, 2003).

2.5. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptozda patolojik ve fizyolojik bakımdan instrinsik (mitokondriyal) yol ve ekstrinsik yol olmak üzere 2 yolak ile hücre ölümü gerçekleşmektedir.

Apoptozda sinyal iletiminden sonra hücrede bir takım değişiklikler gözlenir. Bu değişimler morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerdir.



Şekil 5. İntrinsik (İç) ve Extrinsik (Dış) Apoptoz Yolları (Wanner vd., 2021)

2.5.1. İntrinsik (iç) mitokondriyal yol

Uyaranın reseptörlerden bağımsız olarak farklı bir yol ile etki etmesi intrinsik ya da mitokondriyal yol olarak adlandırılır. İntrinsik apoptotik yolak, hücre içi sinyallerle, pH azalmasına bağlı olarak gen seviyesindeki toksik hasar, endoplazmik retikulum stresi, DNA hasarına bağlı hücre siklus bozuklukları, mitokondriyal hasar ve onkojenlere bağlı hücre ölümü ya da çeşitli büyüme faktörleri gibi bazı uyaranların

yokluğunda aktive olur (Dağdeviren, 2021). Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) ailesi üyeleri mitokondriyal yolağın düzenleyicileridir (Coşkun ve Özgür, 2011). Bu proteinlerin çeşitli etkileşimleri ile hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceği belirlenir.

İntrinsik mitokondriyal yol hücre içerisindeki hedeflerle direkt etkileşimdedir. Bu sürece hücre içi sinyaller üreterek reseptör olmayan uyaranlar aracılık eder. İntrinsik yolu başlatan negatif ya da pozitif uyaranlar olabilir. Negatif sinyaller, ölüm programının baskılanmasının başarısız olmasına neden olan bazı büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinlerin olmadığı durumları içerir. Bu sinyaller sonucunda apoptoz tetiklenir. Pozitif uyaranların tamamı ise mitokondrial permeabilite geçiş poru (MPT)'nin açılmasına yol açarak iç mitokondrial membranda değişikliklere neden olabilir (Eröz vd. 2012).

2.5.2. Ekstrinsik (dış) yol

Ekstrinsik yol ya da ölü reseptör yolu apoptozisi transmembran reseptör aracılı etkileşim ile başlar. Bu sinyal yolunda TNF reseptör gen süper ailesinin üyeleri olan ölüm reseptörlerini içeren transmembran reseptörleri rol almaktadır (Coşkun, ve Özgür, 2011). TNF reseptör aileleri sistince zengin ekstrasellüler domainler içerir. Öldürücü domain olarak adlandırılan bu yapı yaklaşık 80 aminoasitlik bir sitoplazmik domaine sahiptir (Eröz vd. 2012). Bu domainler hücre yüzeyi ve hücre içi sinyal yolunda öldürücü sinyalin aktarılmasında önemli bir role sahiptir.

2.6. Apoptoz Tayini

Apoptoz için birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim sinyal iletiminden hemen sonra gözlenir. Hücre küçülmeye ve yoğunlaşmaya başlar. Hücre iskeleti dağılarak çekirdek zarı parçalanır. Böylelikle çekirdekte bulunan DNA da parçalara ayrılır. Apoptoza uğrayan bir hücrede kromatin ve çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin parçalanması sonucu çekirdekte yoğunlaşma başlar Hücre küçülmeye devam eder ve membranla çevrili küçük parçalara ayrılır. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş

organeller ve çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimler oluşur (Pınarbaşı, vd. 2007).

Çekirdek de hücre gibi büzülür ve bazen membranla sarılı olarak parçalanabilir. Nüklear porlar kromatinin membrana komşu olmayan bölgelerde yoğunlaştığı görülür (Güleş ve Eren 2008).

Apoptoz sırasında apoptotik hücrelerin membranlarında da değişimler gözlenir. Hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde yer alan negatif yüklü fosfolipidlerin hücre membranının dış yüzeyine çıkar. Kollektin (C1q) adı verilen çeşitli proteinler apoptotik hücrelerin zarına bağlanır. Hücre içeriklerini içine alan ve membranla çevrili olan veziküller, apoptotik hücrelerden kopan parçalar "apoptotik cisim" olarak da adlandırılırlar (Güleş ve Eren 2008).

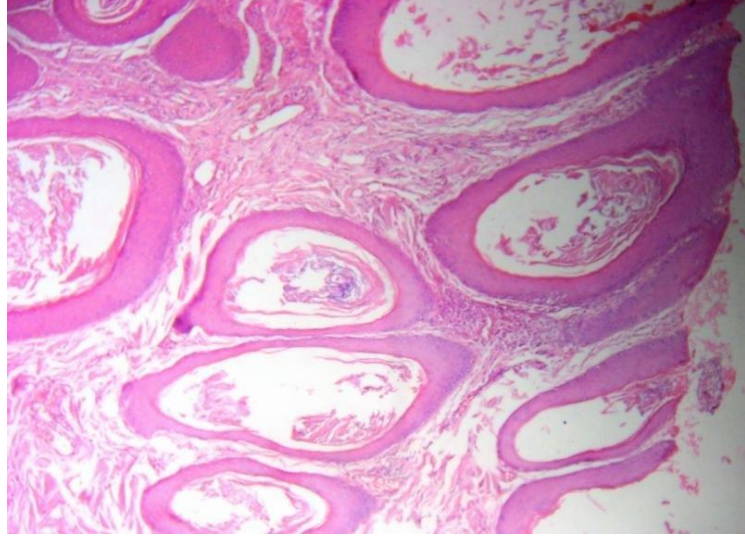
Apoptozun gözlenmesinde belirleyici olan diğer bir olay ise hücre içi Ca ve Mg bağımlı endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu ile kromozomal DNA'nın nükleozomal birimlere parçalanmasıdır (Güleş ve Eren 2008). Apoptozisin tespiti için kullanılan yöntemler oldukça fazladır. Apoptozis hücrelerdeki morfolojik yapı ve apoptozise özgü olduğu bilinen proteinlerin/kaspazların moleküler düzeylerde tespiti ile yapılabilmektedir. (Dinçel ve Kul, 2016).

2.7. Apoptozun Gösterilmesinde Başlıca Kullanılan Temel Yöntemler

2.7.1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri

2.7.1.1 Işık Mikroskopik Teknikler

- Hematoksilen Boyama
- Giemsa Boyama

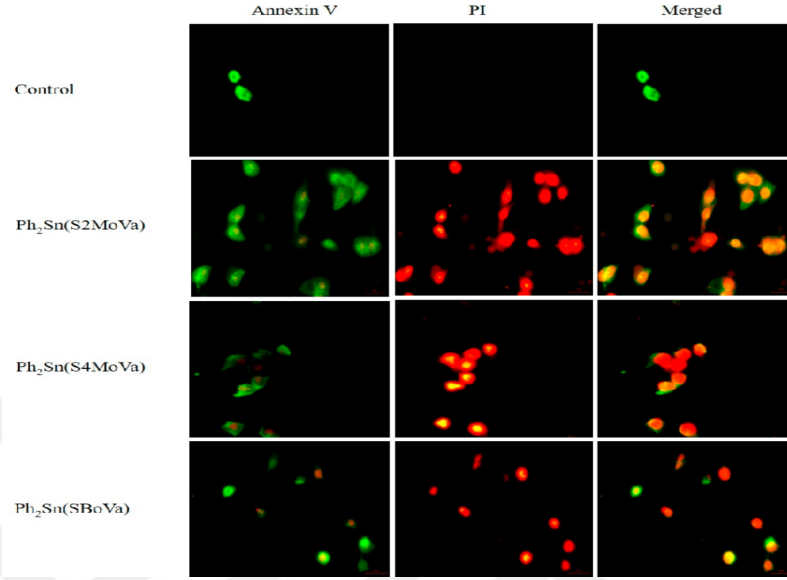


Şekil 6. Hematoksilen-eozin Boyama ile Trichoblastoma Hücrelerinin Görüntüsü (Ergin ve Alihosseini 2009).

Hematoksilen-eozin (HE) ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir. HE boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyayarak apoptotik hücreler nükleus morfolojisindeki değişiklikler gözlemlenir. Bu boyama yöntemi ile hücre veya sitoplazmik küçülme, kromatindeki yoğunlaşma ve nükleus zarının periferinde toplanması, nükleusun küçülmesi ve parçalanması gözlemlenebilir (Mountz ve Zhou, 2001).

Giemsa boyama Giemsa ile boyamada, hematoksilen-eozin ile boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisindeki değişiklikler gözlenerek apoptotik hücreler tanımlanır (Güleş ve Eren 2008).

2.7.1.2. Floresan Mikroskobu



Şekil 7. Apoptozun Floresan Mikroskobu Görüntüleri (Yusof vd. 2019).

- Propidium İyodür (PI) Geçirgenliği
- Hoechst Dye

Floresan mikroskopi, floresan maddelerin (örn. Hoechst boyası, DAPI “4,6-diamidine-2’-phenylindole”, propidium iyodür, akridin orange, etidyum bromür, FITC “fluorescein isothiocyanate”) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir (Güleş ve Eren, 2008). Floresan boyalar DNA’ya bağlanarak hücrenin nukleusu görünür hale getirir. Canlı veya ölü tüm hücreleri boyayan bir boya ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya beraber kullanılarak canlı ve ölü hücre ayrımını yapabilir (Güleş ve Eren, 2008).

2.7.1.3. Elektron Mikroskobu Yöntem

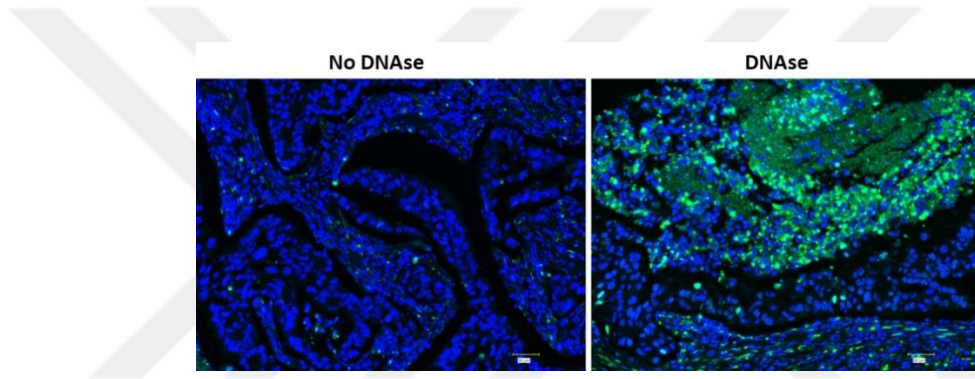
Morfolojik değişiklikler elektron mikroskobu ile en doğru şekilde gözlemlenebilir. Elektron mikroskobu yöntem ile sitoplazmik küçülme, kromatin kondenzasyonu ve fragmentasyonu, mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi detaylar incelenebilir.

2.7.1.4. Faz Kontrast Mikroskobu ile Görüntüleme

Faz kontrast mikroskobu ile hücrelerin kültür ortamında, hücreyi veya hücre topluluğunu incelenebilmektedir. Canlı hücrelerin, hücre içi yapılarının incelenmesi ve hücre membranındaki değişimleri incelenmesinde kullanılır (Karakoç vd., 2016).

2.7.2. İmmunohistokimyasal yöntemler

2.7.2.1. TUNEL Yöntemi



Şekil 8. TUNEL testi ile DNase ile muamele edilmiş doku kesitinde DNA ipliği kırılmaları ve apoptozun gösterilmesi (AAT Biyoquest, Sabit Hücre ve Doku TUNEL Apoptoz Test Kiti, 22.05.2024, https://www.aatbio.com/products/cell-meter-fixed-cell-and-tissue-tunel-apoptosis-assay-kit-green-fluorescence#jump_citation)

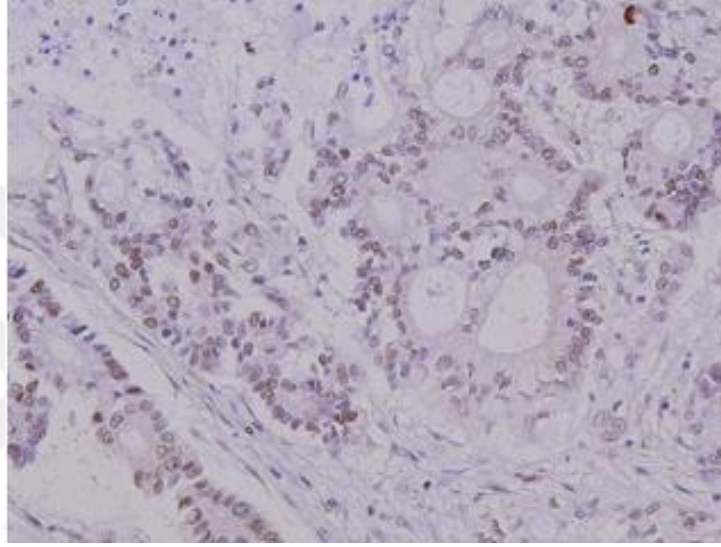
Bu yöntem ile apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenir. Terminal deoksinnükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme olarak daha duyarlı bir yöntem olarak gösterilmiştir. TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidlerin işaretlenmesi ile floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğerlerinden ayırmada kullanılmaktadır (Güleş ve Eren, 2008).

2.7.2.2. Anneksin V Yöntemi

Sağlıklı hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin hücre apoptoza uğradığında normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS (fosfatidilserin) molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olur. Bu yer

değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptozun erken dönemlerinde gözlemlenir. Anneksin V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanarak floresan bir madde ile işaretlenir. Böylelikle apoptotik hücre görünür hale getirilir (Dinçel ve Kul, 2016). Flow sitmetri ile FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı ölçülebilmektedir.

2.7.1.3. M30 Yöntemi



Şekil 9. Pankreas Kanseri Dokusunda Apoptozun M30 İmmünohistokimya Yöntemi İle Belirlenmesi (Tajima vd. 2012)

M30 yönteminde apoptotik hücreler, sitokeratin 18'in kaspazların aracılığı ile kırılması sonucu açığa çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal boyanmasına dayanarak belirlenirler. Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılmaktadır. Sitokeratin 18 (CK18) çoğunlukla akciğer, karaciğer, prostat, göğüs ve kolon kanser tiplerinde gözlenir. Lenfoid ve nöral hücrelerde bulunmamaktadır (Dinçel ve Kul, 2016).

Kaspaz-3 yöntemi ile apoptotik hücrelerde görülen aktif Kaspaz-3 immunohistokimyasal yöntem ile belirlenir. Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için dokuda apoptozise yol açan etkenin Kaspaz 3'ü aktive edip etmediğinin bilinmesi gereklidir (Dinçel ve Kul, 2016).

2.7.3. Biyokimyasal yöntemler

2.7.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi

- DNA fragmentasyonu

Agaroz DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için en yaygın kullanılan yöntemdir. Jelde moleküllerin hareket ettiği por çapı agaroz konsantrasyonu ayarlanarak değiştirilebilir. Jelin konsantrasyonu arttıkça porların çapı küçülür. Böylece küçük DNA parçaları için yüksek, büyük DNA parçaları için ise düşük agaroz konsantrasyonları kullanılarak nükleik asitlerin en iyi şekilde ayrışmaları sağlanır (Dinçel ve Kul, 2016). Floresan bir boya olan ethidium bromide ile boyanarak ve UV ışığı altında DNA parçaları görüntülenir.

2.7.3.2 Western Blot Yöntemi

- Aktif kaspaz'ın belirlenmesi
- Sitokrom c salınması
- Substrat kırılması

Western blotlama bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü saptamak için kullanılır. Bu metot istenilen bir proteine affinitesi olan bir antikor kullanımına bağlıdır. Bu antikor prob olarak kullanılarak bir karışımın içinden istenilen proteinin saptanmasını sağlar. Bu metot ile apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıkları saptanır.

2.7.3.3. Flow Sitometri

Flow sitometrede farklı moleküller, hücreler, düşük ve dik açılı ışık yayılımı kullanılarak büyüklük ve şekil olarak belirlenir. Bu hücreler, moleküller özel floresan işaretleyicilerle veya boyalar ile antikorlarla işaretlenebilir (Dinçel ve Kul, 2016). Böylelikle floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteini saptanarak apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve

kantitatif sonuç veren bir yöntem olması avantaj sağlamaktadır. Apoptoz flow sitometri uygulamasında floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak ve Anneksin V kullanılarak belirlenebilir (Ulukaya, 2003).

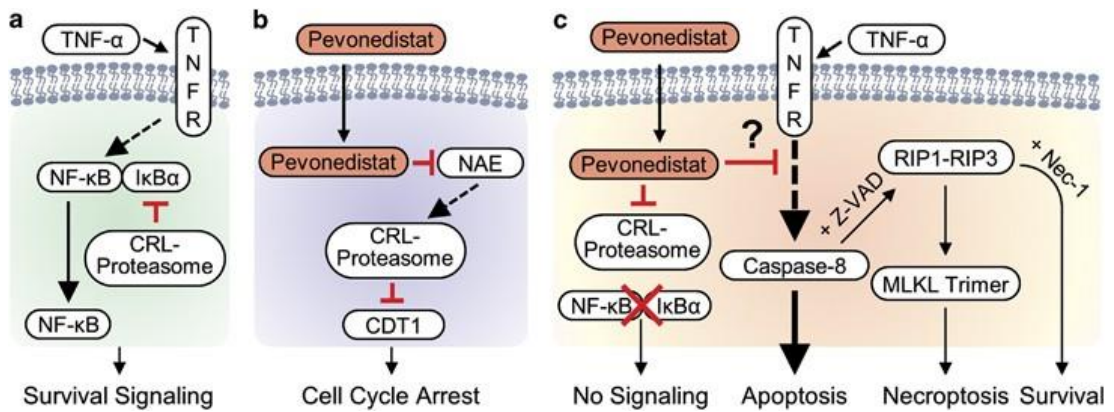
2.7.4. İmmunolojik yöntemler

2.7.4.1 ELISA

- DNA fragmentasyonu
- Kaspaz Aktivasyonu

ELISA yöntemi kültürü yapılmış hücrelerin ve plazmada DNA kırıkları tespit edilebilir (Dinçel ve Kul, 2016). ELISA yönteminde antijen-antikor kompleksine enzim ile işaretlenmiş olan anti-globulinin ilave edilir. Daha sonra substratın eklenmesi antijen ve antikor renk oluşumunun gözlenmesi ile sonuç alınır (Güleş ve Eren, 2008). Duyarlı ve hızlı sonuç veren bir test olması avantaj sağlamaktadır.

2.8. MLN4924'ün hücre yolaklarındaki etkisi



Şekil 10. MLN4924'ün Etki Mekanizması (Wolenski ve Dragan, 2015).

Pevonedistatın bir başka etki mekanizmasının apoptozu indükleyen TNF-α ile etkileşerek TNFR'nin uyarılmasını sağlamasıdır. Bunun sonucunda NF-κB sağkalım

sinyali aktive edilerek CRL-proteazom bozulması düzenlenir.Yapılan bir çalışmada NAE ve buna bağlı olarak proteozomun inhibisyonu ile CDT1 gibi birçok proteinin bozulması önlenerek DNA replikasyonu ve hücre döngüsünün durması sağlanmıştır (Wolenski ve Dragan, 2015). Ayrıca pevonedistat ve TNF- α kombinasyonunun hem in vitro hem de in vivo sitotoksik olduğu bildirilmektedir. (Wolenski ve Dragan, 2015).

Şekil 11. Neddilasyon Kademesindeki Ana Proteinlerin Şematik Gösterimi (Chung ve Dellaire 2015).

1. Aktivasyon
2. Konjugasyon
3. Ligasyon.

Culling-RING ligazları (CRL'ler), E3 ubikuitin ligazlarının en büyük ailesidir. Cullin bazlı E3 ligazları, hücre sinyallemede, transkripsiyonel düzenlemede ve hücre döngüsü kontrolünde yer alan proteinler de dahil olmak üzere, çeşitli işlevlere sahip olan geniş bir ubikuitin ligaz ailesini içerir. CRL'ler, çeşitli anahtar substratların bozulması ile hücre döngüsü ilerlemesi, hücre proliferasyonu, DNA onarımı ve apoptoz gibi birçok önemli biyolojik süreci düzenlemede rol oynar (Shi vd. 2020).

NEDD8 (nöral öncül hücrede eksprese edilen, gelişimsel olarak aşağı regüle edilmiş protein 8), cullin ailesinin proteinlerine bağlanabilen ubikuitin benzeri bir proteindir. Ubikuitin E3 ligazlarının bir alt sınıfının aktivitesi için gereklidir. Neddilasyon, NEDD8'in hedef proteinlere konjuge edilmesi sürecidir. Neddilasyon sürecinde E1 NEDD8-aktif edici enzim (NAE), E2 NEDD8-konjuge edici enzim (UBC12) ve NEDD8'in bir hedef moleküle transferini katalize eden E3 NEDD8 ligaz gerektirir (Soucy vd. 2009). Neddilasyon sürecindeki aksaklıklar çok sayıda hücre içi proteinin birikmesine yol açarak DNA hasarı oluşumuna, otofajiye, apoptoza ve anormal hücrel tepkilere yol açabilir.(Soucy vd. 2009).

Neddilasyon, NEDD8'in hedef proteinlerine konjuge edildiği translasyon sonrası modifikasyondur. Neddilasyon, ubikuitinasyona benzer, ancak neddilasyon, E1'i (NEDD8 aktif edici enzim 1'in bir heterodimeri [NAE1]/ubikuitin benzeri değiştirici aktif edici enzim 3'ün [UBA3] bir heterodimeri) ve E2'yi (ubikuitin konjuge edici enzim E2 M; UBE2M; UBC12) kullanır (Kerscher vd., 2006). NEDD8, cullin ailesi proteinine bağlanabilir. Ubikuitin E3 ligazlarının bir alt sınıfı olan CRL aktivitesini modüle etmek için gereklidir. Süreç sonrasında protein kompleksleri proteozom tarafından sindirilir. HER2'nin neddilasyonunun, protein bozulmasını engelleyerek meme kanseri çoğalmasını arttırdığı gözlemlenmiştir (Chiba ve Tanaka, 2004.). Bu çalışma göz önünde bulundurulduğunda neddilasyonun kanser hücrelerine hayatta kalma avantajı sağladığı söylenebilmektedir.

Seçici bir NAE inhibitörü olan MLN4924'ün umut verici bir anti-kanser ilacı olduğu rapor edilmiştir (Kobayashi vd., 2004). MLN4924 tedavisi, cullin neddilasyonu ve toplam NEDD8-konjuge protein düzeylerini önemli ölçüde azaltarak anti-anjiyogenik etkisi endotel hücrelerinde gözlemlenmiştir (Soucy vd. 2009).

2.9. Kullanılan etken madde ve kullanım amacı

Birden fazla etki mekanizması tanımlanmış olmasına rağmen, MLN4924'ün hücre ölümünü nasıl indüklediği büyük ölçüde tanımlanamamıştır. Proteazomal inhibitörlerden biri olan MLN4924, enzimatik Neddilasyon kademesinin ilk adımını yöneten Nedd8 aktive edici enzimin (NAE) inhibitörü olan bir moleküldür.

Nedilasyon, çeşitli biyolojik süreçleri düzenleyen bir tür posttranslasyonel modifikasyondur. MLN4924'ün, Cullin-RIG ligazlarının CRL'lerin aktivasyonunu seçici olarak önleyen ve hücrel proteinlerin ubiquitination ve proteasomal degradasyonunu değiştirdiği bildirilmektedir (Tong vd., 2017).

NAE'nin inhibisyonu, kanserde hücre ölümüne yol açan bir reaksiyon mekanizmasıdır. Yapılan birçok çalışmada pevonedistatin aktivitesi prostat, akciğer, yumurtalık, karaciğer gibi bir çok solid tümörlerde antitümör etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Wong vd., 2017). Böylelikle antikanser etkilerinin birincil mekanizmaları, DNA hasarı, apoptoz, yaşlanma ve otofajinin indüksiyonunu sağlar (Wang vd., 2017). Ayrıca anormal anjiyogenez, tümör büyümesi ve metastazında da görev alır (Wang vd., 2017). MLN4924, tüm Culli'lerin nedilasyonunu engelleyerek substuratlarının birikmesine neden olur. Böylelikle DNA replikasyonunu engeller, apoptoz otofaji ve yaşlanmayı tetikleyerek kanser hücrelerini baskılar (Tong vd., 2017).

2.10. Kontrollü salım çalışmalarında kullanılan taşıyıcı çeşitleri

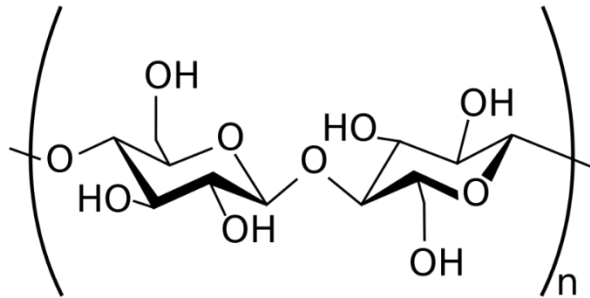
Uygun polimer seçimi, kullanılan polimer, ilaç enkapsülasyon verimi, ilaç salım oranı, ilacın biyoaktivitesi ve hücre ve ilaç etkileşimini etkilemesi sebebi ile oldukça önemlidir. İlaç çözünürlüğü ve stabilitesi ile salım sisteminin kontrollü ya da hedeflenmiş salım olmasında da seçilen polimer önemlidir. Polimer çeşitleri sentetik olabileceği gibi doğal ve sentetik polimerlerin kombinasyonu şeklinde de olabilir.

Doğal polimerler doğada bulunan polimerlerdir. Polisakkaritler, proteinler ve polinukleotidler doğal polimerler olarak sınıflandırılmışlardır (Aydın ve Ünlüel

2022). Kitin, selüloz, alginat, amiloz, ksantan gam, pektin, nişasta, dekstran, siklodekstrin, ipek, jelatin, kazein, kolajen, hiyaluronik asit doğal polimerlere örnek olarak verilir. Biyouyum ve enzimatik olarak bozunur özellik gösterirler. Bu polimerlerin avantajları arasında bol bulunmaları ve kolay saflaştırılabilmeleri vardır (Aydın ve Ünlüel 2022). Ayrıca gerekli olan tedaviye yönelik ihtiyaçlar doğrultusunda etki düzeylerinin kimyasal olarak modifiye edilebilmeleri de büyük avantaj sağlamaktadır.

2.11. Selüloz

Selüloz, farklı yollar ve farklı kaynaklardan hazırlanabilen doğal bir polimer malzemedir. Yüksek mukavemet, geniş yüzey alanı, düşük yoğunluk, yüksek hidrofiliklik gibi avantaj sağlayan birçok özelliğe sahiptir. Biyouyumlu ve yenilenebilir olması selülozun kullanım avantajlarından. Selüloz yüzey modifikasyonu ile istenilen özelliklerin kazandırılabilirdiği çok sayıda hidroksil grubuna sahiptir (Liu vd. 2023). Selüloz makromoleküler zincirindeki her D-glukoz birimi üç hidroksil grubuna sahiptir (Cheng vd. 2023). Bu özellikleri sayesinde gıda, ilaç ve kompozit malzemeler gibi çeşitli alanlarda uygulanabilen umut verici bir malzemedir.



Şekil 12. Selüloz β -D Glukoz Polimeri

Selüloz , β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glikozidik bağlarla bağlanan sellobiyoze tekrarlı zincirlerden oluşan dallanmamış doğrusal bir polimerdir. Selüloz zincirinde bulunan polar

hidroksil grubu C-6 pozisyonu birincil hidroksil grubudur. C-2 ve C-3 pozisyonları ikincil hidroksil gruplarıdır (Cheng vd. 2023). Selüloz zincirinin sağ uç grubunun, kimyasal olarak uç olarak bilinen bir hemiasetal yapısıdır. Sol uç grubu ise aynı zamanda indirgeyici olmayan uç olarak da bilinen bir hidroksil grubu tarafından süspanse edilir (Cheng vd. 2023). Hidrojen bağının düşük yoğunluğu nedeni ile, selüloz lifleri, moleküler zincirlerinin oldukça düzenli bir yapıda düzenlendiği heterojen bölgelerin (kristalin bölgeler) yanı sıra zincirlerin dağınık ve düzensiz olduğu bölgelere (amorf bölgeler) sahiptir (Cheng vd. 2023).

Selüloz oksidasyon, esterifikasyon, aşılama ve çapraz bağlanma yoluyla tasarlanabilir özelliklere sahip çeşitli türevlerin geliştirilebilir (Gong vd. 2024). Selüloz türevleri, organik çözücülerdeki çözünürlükleri ve yapısal olarak modifiye edilebilir yapıları nedeniyle saf selüloza uygun alternatiflerdir (Gong vd. 2024). Düşük maliyetli, biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, onları biyomedikal ve biyoanalitik uygulamalar için avantajlı hale getirir. Bunun yanı sıra elektrostatik adsorpsiyon veya hibrit yükleme yöntemleriyle inorganik malzemelerle de birleştirilebilir (Cheng vd. 2023).

Çevre kirliliğine ve değerli kaynakların israfına neden olan tekstil üretiminde ortaya çıkan atık (telef) pamuk, %95-99 oranında selüloz içermektedir. Selüloz, polisakkarit esaslı doğal bir polimerdir. Atık pamuğun geri dönüşümü ile, selüloz hammadde kaynağı olarak kullanımı, ekonomik ve çevresel nedenler sebebiyle önem arz etmektedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Rejenere Selüloz Eldesi

Çalışmada, telef pamuğun, safsızlıklardan arındırılması amacı ile ön arıtma işlemleri, gerçekleştirilmiştir. Daha sonra asit karışımı ile rejenere selülozun hidroliz işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 3 g telef pamuk tartılarak ince şekilde küçük parçalara ayrılan atık pamuk %3'lük 500 ml NaOH ile bir reaksiyon kabında, 6 saat boyunca, 200 rpm karıştırma hızına ayarlanan ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde kaynatıldı. 1 gece çözeltide bekletilerek safsızlıklar giderildi. Daha sonra saf su ile yıkama işlemi sonrası santrifüjde 300 rpm'de çöktürülerek nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Nötralizasyon sonrasında %6'lık NaClO ile 1 saat kaynatılmıştır. Tekrar nötralizasyon işlemi sonrası 1:2:2 oranında hazırlanan Nitrik asit (HNO_3) (%68w/w):Hidroklorik asit (HCl) (%37w/w):saf su oranlarında hazırlanan asit karışımı ile 60°C de 1 saat muamele edilmiş daha sonra 7 gün 200 rpm'de manyetik karıştırıcı üzerinde bırakılarak selülozun kısmi hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kalıntı pH 7 sağlanana kadar saf su ile yıkanarak soğutmalı santrifüjde 14000 rpm'de çöktürülerek tekrar nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hidroliz tamamlandıktan sonra rejenere selüloz etanolden geçirilerek 37°C'ye ayarlanan etüvde kurumaya bırakılmıştır. Böylece safsızlıklardan arındırılmış rejenere selülozun karışık asit ile hidrolizi ile amorf kısımlar uzaklaştırılmıştır.

3.2. Selüloz Esaslı Taşıyıcı Eldesi

Elde edilen rejenere selüloz bir reaksiyon kabında, %30'luk(v/v) sülfürik asit (H_2SO_4) (%95-97w/w) çözeltisi ile 6 gün boyunca 200 rpm'e ayarlanan manyetik karıştırıcı üzerinde muamele edilmiştir. Örnekler son 3 gün 4'er saat sonikasyon işlemi gerçekleştirilerek selüloz esaslı taşıyıcılar çalışmaya uygun boyuta getirilmiştir. Çözeltiden elde edilen örnek soğutmalı santrifüjde 14000 rpm'de pH 7 olana dek saf su ile yıkanarak ve nötralizasyon sağlanmıştır. Bu işlem 2 kere tekrar

edilmiştir. Elde edilen örnek 37°C'ye ayarlanan etüvde kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen taşıyıcıların boyut analizleri yapılmıştır.

3.3. Selüloz Esaslı Taşıyıcın Sodyum Periyodat Oksidasyon Yöntemi İle Modifikasyonu ve Aldehit Grubu Tayini

Selüloz esaslı taşıyıcıların modifikasyonu için sodyum periyodat (NaIO_4) ile oksidasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Nikolic vd., 2010). Selüloz moleküllerindeki -OH gruplarının, reaktif gruplar olarak, aldehit gruplarına modifikasyonu amaçlanmıştır. Bunun için 12 g selüloz esaslı taşıyıcılar 1 ml'lik destile su içinde dağıtılarak 20 dakika sonikasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra selüloz esaslı taşıyıcılar her tüpe 250 µl alınarak 4 tüp içinde 0.1 M pH:4.5 asetik asit-sodyum asetat tamponu ile toplam hacim 5 ml'ye tamamlanmıştır. Optimum NaIO_4 konsantrasyonunu belirlemek için %2-10 (g/ml) her deney tüpüne 0.1-0.5 g NaIO_4 ilave edilmiştir. Reaksiyon kapları 2 saat boyunca karanlıkta manyetik karıştırıcıda 400 rpm'de karıştırılmış daha sonra karışımlar 4,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

3.4. Selüloz Esaslı Taşıyıcı Karakterizasyon Yöntemleri

3.4.1 SEM analiz yöntemi

SEM analizi ile örneklerin yüzey yapıları ve boyutları belirlenmiştir. Taşıyıcıların yüzey analizi, SEM görüntüleri, hizmet alımı ile ODTÜ MERLAB analiz laboratuvarına örneklerin gönderilmesi sonucu elde edilmiştir

3.4.2 FTIR analiz yöntemi

FTIR analizi maddeyi oluşturan molekül içi bağların ve fonksiyonel grupların titreşim frekanslarına karşılık gelen absorpsiyon pikleri ile örneğin karakterize

edilmesi esasına dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir. Sodyum periyodat oksidasyonu sonrası selüloz esaslı taşıyıcıların FTIR spektrumları alınarak fonksiyonel gruplarda ki değişim Thermo Scientfic IS10-ATR-FTIR cihazı ile incelenmiştir.

3.5. MLN4924 Yüklü Selüloz Esaslı Taşıyıcıların Eldesi

Bu aşamada ilacın farklı konsantrasyonlarında (0,1- 0,01- 0,002mg/ml) 245 nm de absorbans ölçümleri yapılarak kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. 0,01 mg/ml konsantrasyonundaki ilaç çözeltilisinin 245 nm'deki absorbans değeri çalışma için uygun görülmüştür ve ilaç yükleme çalışmaları bu ilaç konsantrasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 200 µl okside selüloz esaslı taşıyıcı (3mg/mL), 0,01 mg/ml derişimindeki 1ml etken madde ile muamele edilmiştir. Numuneler 24 saat boyunca karanlıkta çalkalamalı inkübatörde karıştırıldıktan sonra 4000 rpm'de santrifüjlenmiştir. İlaç yükleme kapasitesinin belirlenmesi kapsamında supernatant absorbans değeri ölçüldüğünde verim elde edilmediği gözlemlenmiştir. Bu yüzden ilaç yükleme çalışmaları kapsamında, modikasyon işlemi görmemiş selüloz esaslı taşıyıcıya ilacın adsorbsiyon yöntemi ile yükleme çalışmalarına geçilmiştir. Bu amaçla 0,01 derişimindeki 1 ml ilaç, sodyum periyodat modifikasyonu gerçekleştirilmemiş 3mg/ ml taşıyıcı üzerine ilave edilmiş ve 24 saat inkübasyon ile ilacın taşıyıcıya adsorbsiyonu işlemi sonucu yükleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. MLN4924 kalibrasyon grafiğinin hazırlanması

Farklı konsantrasyonlarda (0,1, 0,01, ve 0,002 mg/ml) hazırlanan MLN4924'ün 245 nm'de absorbans değerleri belirlenerek kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır.

3.6. MLN4924'ün Selüloz Esaslı Taşıyıcıdan Salım Çalışmaları

İlaç yükleme çalışmaları sonucu elde edilen MLN4924 yüklü selüloz esaslı taşıyıcılar, ilaç salım çalışmaları kapsamında, diyaliz membran (7,000 MWCO) içinde, 5ml ultra saf su bulunan bir behere daldırılmış ve 37 °C'de çalkalamalı su banyosunda salım işlemleri çalışmaları başlatılmıştır. Belirli sürelerle salım ortamından 500 µl örnek alınarak yerine aynı hacimde ultra saf su ilave edilmiştir. Alınan örneklerin UV spektrofotometrefede (245 nm) absorbans değerleri belirlenerek % kümülatif ilaç salım grafiği elde edilmiştir.

3.7. Hücre Canlılık Testleri

Hücre kültürü çalışmalarında, büyüme ortamı olarak %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM besiyeri kullanılmıştır. CO₂ inkübatöründe (Thermo Scientific Forma Stericycle i160 CO₂ Incubator), 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ ve %95 atmosferik nemli ortamda büyütülmüştür. Hücre kültürlerindeki büyümenin günlük takipleri inverted mikroskop yardımıyla yapılmıştır.

Adherent hücre olan U87 hücreleri kullanılarak deneysel çalışma gerçekleştirilmiştir. hücreleri flasktan kaldırmak için yapılan tripsinizasyon işlemi için hücrelerin çoğaldıkları flasklardan besiyeri uzaklaştırıldıktan ve PBS ile yıkandıktan sonra uygun miktarda tripsin eklenerek CO₂ inkübatöründe 5dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda inverted mikroskop ile hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrol edilerek hücrelerin kalkmaması durumunda bir müddet daha inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra flasklara DMEM besiyeri eklenerek 15 ml falkon tüpe aktararak 1200 rpm'de 5 dk hücreler santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti DMEM besiyeri ile süspanse edilmiştir. Pasajlama için bu işlemten sonra platte ekim yapılmıştır.

3.7.1. MTT testi

Hücreler yeteri kadar büyütüldükten sonra, U87 hücreleri üzerindeki hazırlanan selüloz esaslı taşıyıcı, farklı ilaç konsantrasyonları (0,1, 0,01, ve 0,002 mg/ml) ilaç yüklenen selüloz esaslı taşıyıcıların sitotoksitesini belirlemek amacıyla MTT hücre canlılık testi uygulanmıştır (Sadri vd., 2015). MTT testi için U87 hücreleri, 96 kuyulu plakaya her kuyucuğa 200 µl ve 1×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek 24 saat boyunca 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Hücre miktarını ayarlamak için santrifüjden sonra çöktürülüp süspanse edilen hücrelerden 10 µl alınarak thoma lamında sayılmıştır. 3 farklı ilaç konsantrasyonunun her biri kuyucuklara DMEM ile süspanse edilip eklenmiştir. 96 kuyulu plaka'nın her iki sırasına da 0,1, 0,001, 0,002mg/ml konsantrasyonlarında ilaç eklenmesi yapılmıştır. Ayrıca bir kuyucuğa sadece selüloz esaslı taşıyıcı, başka bir kuyucuğa da ilaç(MLN4924) yüklü selüloz esaslı taşıyıcı eklenmiştir. Kontrol olarak bir kuyucuğa hücre ekimi ve diğer bir kontrol için diğer kuyucuğa DMEM ekilmiştir. Bu işlem her kuyucuğa 100 µl besi yeri ve 10µl ilaç eklenerek gerçekleştirilmiştir.37°C'de CO₂ inkübatöründe 24 ve 48 saatlik denemeler için hazırlanmış olan plakalar inkübasyona bırakılmıştır. 24ve 48 saatlik inkübasyonun ardından, PBS (phosphate buffered saline) içerisinde hazırlanmış 5 mg/ml konsantrasyonda MTT çözeltisinden, her kuyucuğa 100 µl eklenmiştir. 37°C derecede CO₂ inkübatöründe 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve 4 saatin sonunda her kuyucuktaki MTT çözeltisi uzaklaştırılarak her kuyucuğa 110 µl DMSO eklenmiştir. 200rpm'de 5 dakika boyunca oluşan formazon kristallerinin çözülmesi amacıyla çalkalandıktan sonra örneklerin absorbansı 570 nm'de mikropilaka okuyucuda ölçülmüştür.

Elde edilen absorbans değerleri aşağıda verilen denklem kullanılarak % canlılık değerleri hesaplanmıştır. Bu sayının 100'den çıkartılması ile % hücre ölüm değerleri elde edilmiştir.

$$\% \text{Sitotoksite} = \frac{\text{Kontrol veya işlenmemiş hücrelerin ort. Abs} - \text{İşlenmiş hücrelerin ort. Abs}}{\text{Kontrol veya işlenmemiş hücrelerin ort. Abs}} \times 100$$

3.7.2. Kristal viyole boyama ile hücre canlılığı tayini

Kültür kaplarına kontrol, 3 farklı konsantrasyonda ilaç MLN4924, selüloz esaslı taşıyıcı, MLN4924 yüklü selüloz esaslı taşıyıcı olmak üzere 5 örnek için 1×10^5 hücre ekimi yapılmış ve hücreler 37°C 'de, %5 CO_2 inkübe edilmiştir. Daha sonra soğuk metanolle -20°C 'de 10 dakika fiks olmaları sağlanmıştır. Örnekler fiksasyon sonrası kristal viyole boyası ile 15 dk muamele edilmiştir. 20 dakika 37°C ' de %5'lik CO_2 ' de inkübasyon sonrasında boya örnekler üzerinden distile su ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırılmıştır (Diversity ve Altundag 2023). Kristal viyole yöntemi ile boyama sonrası görüntüler inverted mikroskobu yardımı ile alınmıştır.

3.7.3 Floresan mikroskobu ile apoptoz tayini

İşlem Elanscience'dan temin edilen Annexin V-FITC/DAPI Apoptosis Detection Kit'in klavuzunda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Buna göre plakaya ekilen hücreler toplanarak hücrelerin 300 rpm 'de 5 dakika santrifij edilmesinden sonra pH 7.4 PBS ile yıkanmıştır. Hücreler süspansiyon edilerek hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Hücre süspansiyonu tüplere bölünerek, her biri için $1 \sim 5 \times 10^5$ hücre, 300 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Hücreler tekrar PBS ile yıkanmıştır. 500 μL tampon çözeltide çözülerek hazırlanan Annexin V binding %1'lik çözeltisi eklenerek hücreler yeniden askıya alınmıştır. Daha sonra her tüpe 5 μL Annexin V-FITC ve 5 μL DAPI eklenerek hücreler vortekslendikten sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 15~20 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler hemen Zeiss AXIO SCOPE A1 cihazı ile analiz edilmiştir. Floresan boyama yöntemi ile boya, DNA'ya bağlanarak hücre nükleusunu görünür hale getirmektedir. Böylece ölü hücreler görüntülenmektedir. Kromotin kondensasyonu veya nükleus fragmentasyonu olan hücrelerin apoptotik hücreler olduğu kabul edilir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1. Rejenere Selüloz Eldesi

Çalışmada selüloz esaslı taşıyıcı eldesi için Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Tekstil Mühendisliği bölümünden temin edilen atık pamuk kullanılmıştır. Atık pamuğun henüz işlem görmemiş formuna ait görüntü Şekil 13. de verilmiştir.



Şekil 13. Atık pamuk

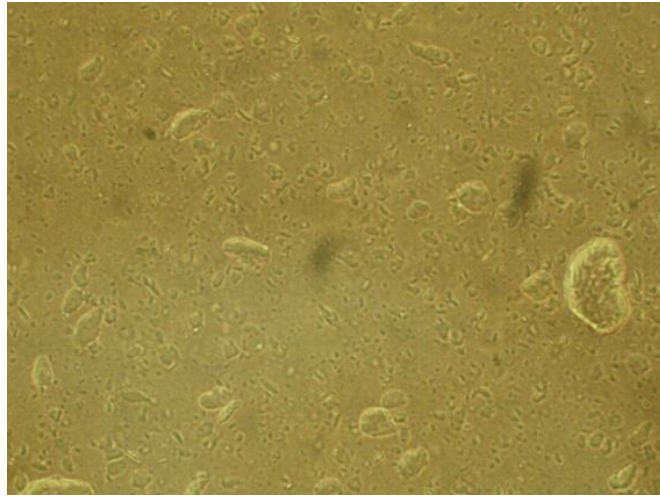
Çalışmada, atık pamuğun ön arıtma ve safsızlıkların giderilmesi işlemleri gerçekleştirildikten sonra elde edilen rejenere selüloza ait görüntüler Şekil. 13’de görülmektedir. Rejenere selüloz lifleri selülozdan elde edilen yapay liflerdir. Pamuk rejenere haline dönüştürülürken kimyasal yapılarında değişiklik oluşmaz. Fiziksel yapıları değişir (Anabi vd. 2020).



Şekil 14. Rejenere selüloz

4.2. Selüloz Esaslı Taşıyıcı Eldesi

Elde edilen rejenere selülozun asit hidrolizi sonrası parçalama işleminin gerçekleşip gerçekleşmediği inverted mikroskop sonrası alınan görüntüler ile tespit edilmiştir (Şekil. 15).

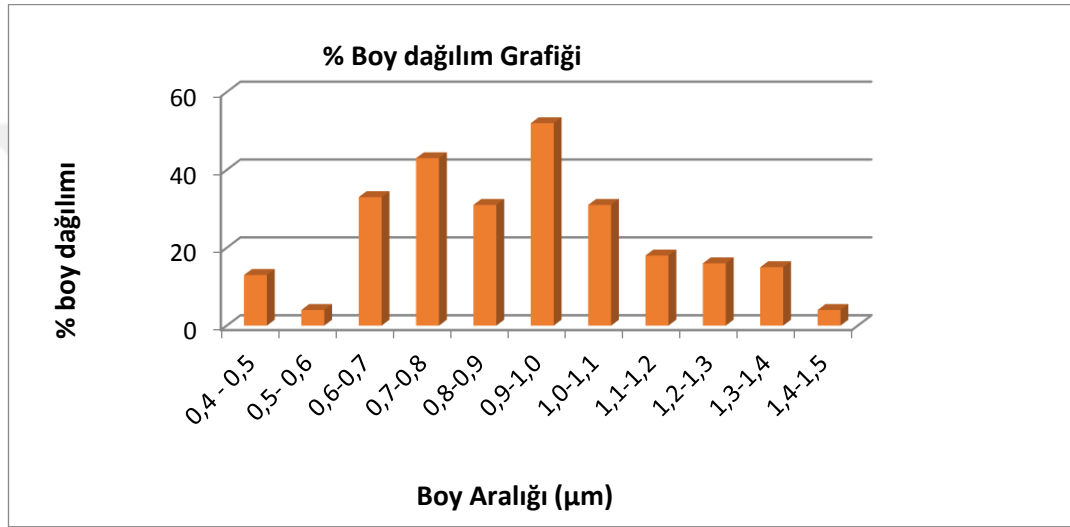


Şekil 15. Selüloz Esaslı Taşıyıcıya Ait İnverted Mikroskop Görüntüleri

Yaptığımız çalışmalarda alınan inverted mikroskop görüntülerinden selüloz esaslı taşıyıcıların asit hidroliz yöntemi ile başarılı şekilde elde edildiği görülmektedir.

Farklı asit hidroliz süreleri ile yapılan deney sonuçlarına göre taşıyıcının asit ile muamele süresi uzadığında, daha küçük boyutlarda elde edilebileceği saptanmıştır. Farklı hazırlama süreleri çalışmaları sonucunda nano ve mikro boyutta taşıyıcının elde edilebileceği belirlenmiştir.

Elde edilen selüloz esaslı taşıyıcıların boy/boy dağılımı, yüzde boy dağılım grafiğinin hazırlanması ile elde edilmiştir (Şekil. 16).



Şekil 16. Selüloz Esaslı Taşıyıcıların Yüzde Boy Dağılım Grafiği

Yapılan çalışma sonucunda selüloz esaslı taşıyıcı başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Selüloz esaslı taşıyıcı hazırlama yöntemi esas olarak büyük selüloz moleküllerinin fiziksel kırma ve kimyasal yapı bozulması yoluyla daha küçük boyutta selüloz moleküllerine ayırmaktır. Taşıyıcı eldesinde, asit ile muamele süresinin değiştirilmesi sonucu farklı boyut aralığında taşıyıcı eldesi sağlanabilmektedir. Çalışmada asit hidroliz süresinin uzatılması sonucu, selüloz esaslı taşıyıcının boyutlarının, küçüldüğü belirlenmiştir. Xiaoshan ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada da asit hidroliz süresinin uzatılmasının, selüloz esaslı taşıyıcı boyutunun küçültülmesinde etkili olduğu bildirilmektedir (Xiaoshan vd. 2021).

4.3. Selüloz Esaslı Taşıyıcının Sodyum Periyodat Oksidasyonu ile Modifikasyonu ve Aldehit Grup Tayini

Selüloz esaslı taşıyıcının modifikasyon işlemleri kapsamında selüloz esaslı taşıyıcı farklı derişimlerdeki sodyum periyodat ile muamelesi sonucu %10 konsantrasyondaki periyodat oranının çalışma için uygun olduğuna karar verilmiştir. Sodyum periyodat ile oksidasyon reaksiyonu sonucu FTIR görüntüleri alınarak değerlendirilmiştir.

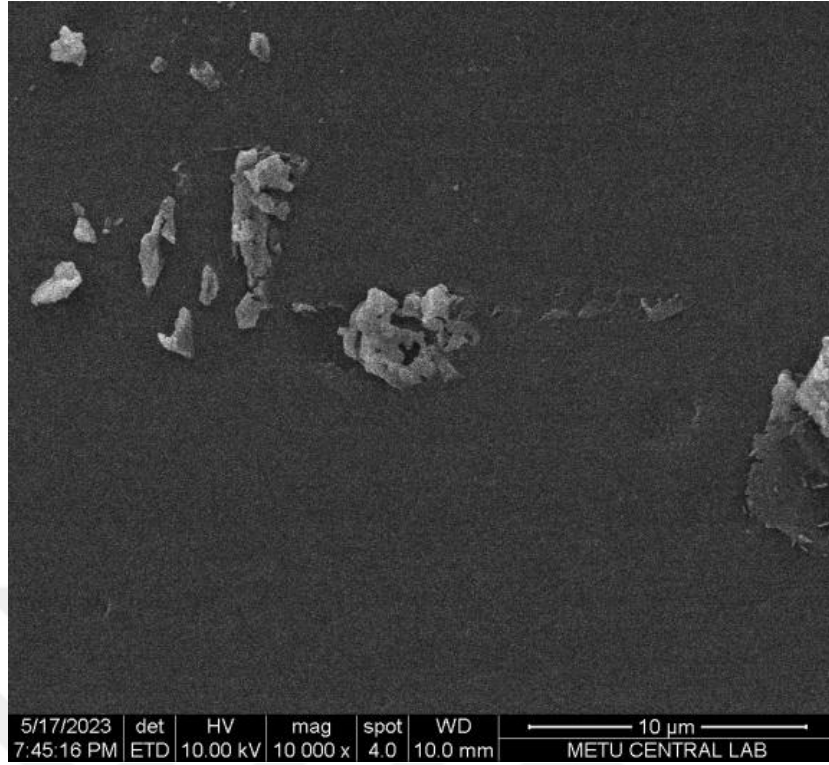
Elde edilen selüloz esaslı taşıyıcıların, NaIO₄ modifikasyon ile dialdehit gruplarının oluşması sağlanmıştır. Selülozun periodat modifikasyonunda anhidroglukoz birimlerinin komşu diolleri ayırarak reaksiyon siklik diesteri üzerinden ilerlemektedir. Bu durum sonucunda aldehit grubuna sahip ürün oluşmaktadır (Poyraz 2018). Selüloz modikasyonu ile elde edilen dialdehit gruplarının, pevonedistat molekülünün yapısında bulunan aminlerle, dimin oluşturmak (Erer, 2019) üzere reaksiyona gerçekleştirilmiştir.

4.4. Selüloz Esaslı Taşıyıcının Karakterizasyonu

4.4.1. SEM analizi

Elde edilen selüloz esaslı taşıyıcıya ait SEM görüntüleri hizmet alımı ile ODTÜ MERLAB analiz laboratuvarına örneklerin gönderilmesi sonucu elde edilmiştir (Şekil 17).

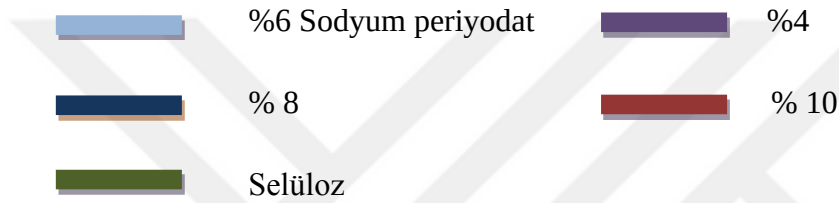
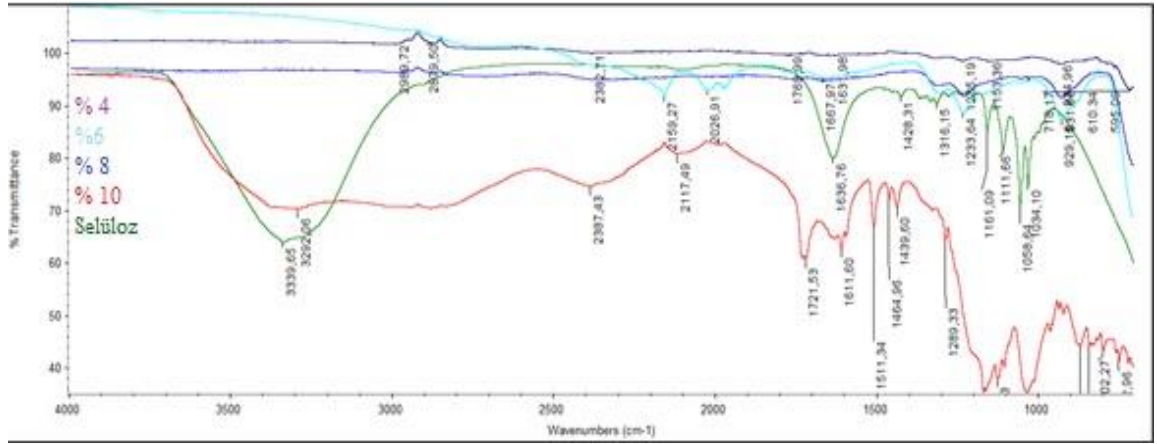
SEM analizleri taşıyıcıları değerlendirmek için önemli rol oynamaktadır. SEM görüntüsünde taşıyıcıların inverted mikroskop ile görüntülenen ve elde edilen boy dağılım verileri ile yakın olduğu görülmüştür.



Şekil 17. Selüloz Esaslı Taşıyıcıya Ait SEM Görüntüsü

4.4.2. FTIR analizi

FTIR analizinin verilerinin, değerlendirilmesi sonucunda absorpsiyon bandının 1721 cm^{-1} 'de görüldüğü gözlenmiştir. Bu pik, selülozun sodyum periyodat oksidasyonu ile modifikasyonunu göstermektedir.



Şekil 18. Elde Edilen Selüloz Esaslı Taşıyıcıların Sodyum Periyodat Oksidasyonu Sonrası FTIR Grafiği

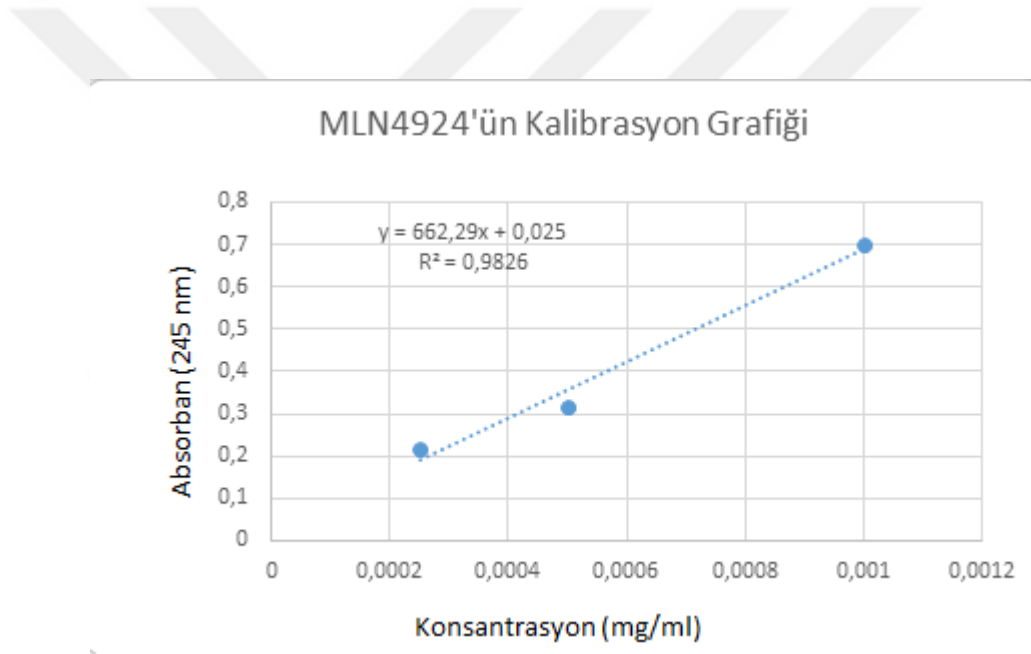
4.5. MLN4924 Yüklü Selüloz Esaslı Taşıyıcıların Eldesi

İlaç yükleme çalışmalarında sodyum periyodat modifikasyonu ile elde edilen selüloz taşıyıcılara ilaç yükleme verimi düşük olduğundan ilaç yükleme çalışmalarına modifiye edilmemiş selüloz esaslı taşıyıcılar ile devam edilmiştir. Bu yöntem ile selüloz esaslı taşıyıcıya ilaç yükleme veriminin %50 olduğu görülmüştür. Selüloza yüksek miktarda yüzey alanı sağlamakta ve bu durum selüloza yüksek ilaç yükleme/salın kapasitesi sağladığı raporlanmıştır (Çaylı, ve Kahraman, 2019). Çalışmada, ilaç ve taşıyıcı inkübasyon süresinin arttırılması, ilaç taşıyıcı oranının yeniden düzenlenmesi gibi bazı parametrelerin gözden geçirilmesinin, ilaç yükleme kapasitesinin arttırılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. İlaç salın çalışmalarında ise selüloz esaslı taşıyıcıdan ilacın salın süresinin, 24 saatin sonunda sonlandığı gözlemlenmiştir. Salın süresini uzatmak için

taşıyıcı boyutları ve şekli ile ilgili bazı parametreler tekrar gözden geçirilebilir (Polat, ve Aytekin 2023).

4.5.1. MLN4924'ün kalibrasyon grafiğinin hazırlanması

MLN4924'ün UV spektrofotometrede max absorbans değeri 245 nm olarak belirlenmiştir. Farklı MLN4924 konsantrasyonlardaki (0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,002 mg/ml) absorbans değerleri ölçülerek ilaç kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır (Şekil 19.)



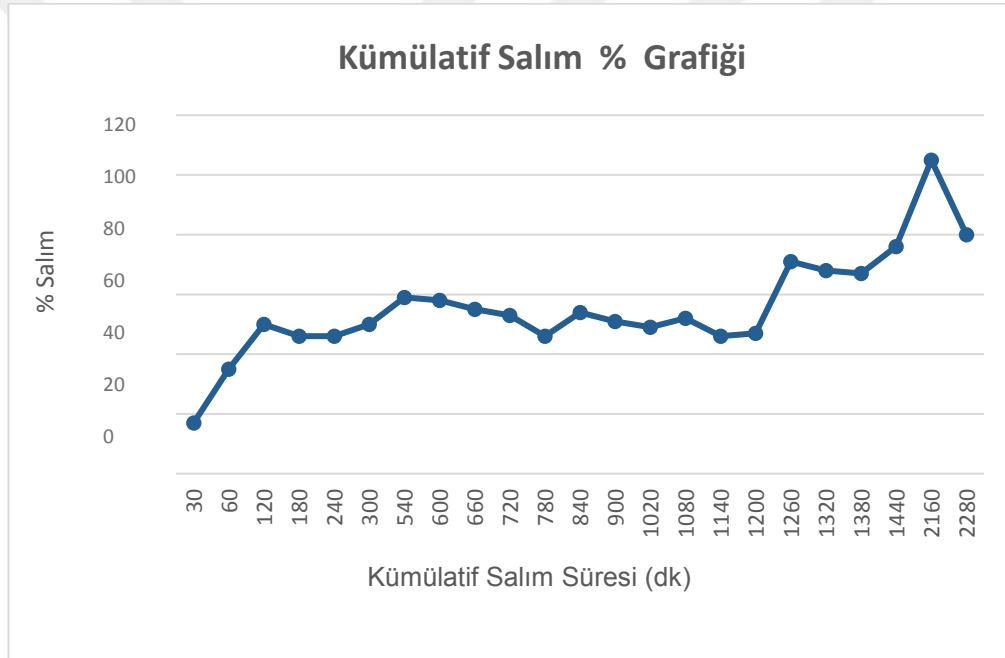
Şekil 19. MLN4924'ün Kalibrasyon Grafiği

4.6. MLN4924'ün Kontrollü Salım Çalışmaları

% Kümülatif ilaç salım çalışmalarında, hazırlanan MLN4924 yüklü selüloz esaslı taşıyıcılar ultra saf su içerisinde dağıtılarak ilaç salım çalışmaları 37°C'de çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Salım çalışmaları, MLN4924'ün

kontrollü bir şekilde 38 saat sonunda selüloz esaslı taşıyıcıdan salımının tamamlandığını göstermiştir. MLN4924 yüklü selüloz esaslı taşıyıcıya ait salım grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 20).

Yapılan bir çalışmada selüloz temelli poliüratan taşıyıcılardan gerçekleştirilen salımda 22. Saate ~ %.41 salıma ulaşıldığı bildirilmiştir (Dinçer vd., 2021). Yaptığımız çalışmada ise şekil 20’de görüldüğü gibi 30. dakikanın sonunda etken maddenin %10’unun salındığı 120. dakikadan itibaren ise 20. saate kadar yaklaşık aynı salım hızında salımın devam ettiği görülmektedir. 20. saatin sonunda selüloz esaslı taşıyıcının degradasyonuna bağlı olarak salım hızının arttığı ve 38. saatin sonunda salımın tamamlandığı belirlenmiştir.



Şekil 20. % Kümülatif MLN4924 Salım Grafiği

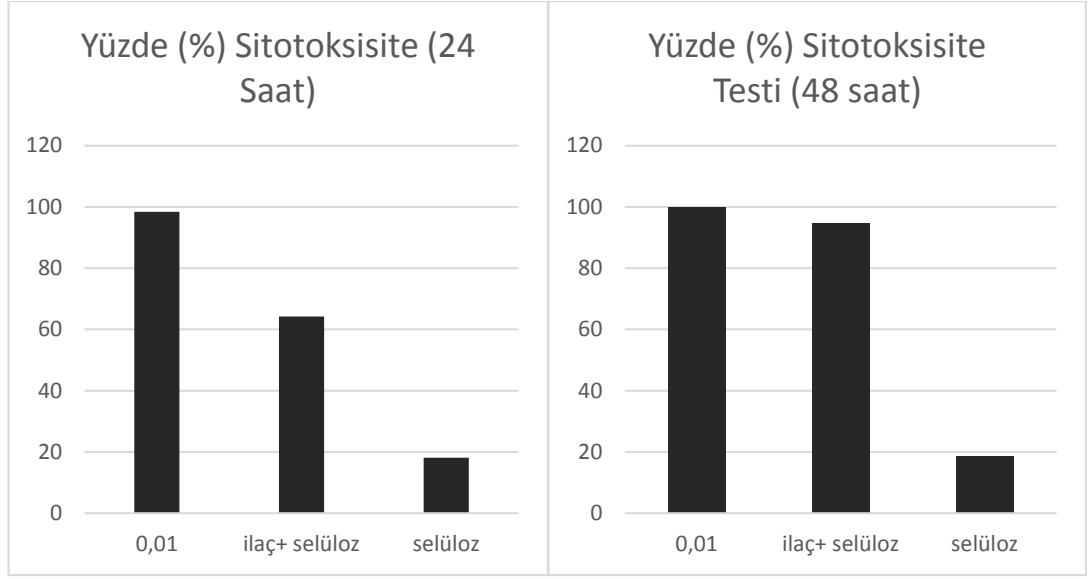
Konvansiyonel dozaj şeklinde, ilaç konsantrasyonunun terapötik olarak aktif olduğu aralığı yakalamak ve devam ettirmek amacıyla, birden çok kez doz uygulanması gerekir. Kontrollü salımda ise, ilaç kullanım sıklıklarının azaltılması mümkündür (Kumar vd., 2003). Bu sistemlerin hazırlanmasında birden çok farklı polimer kullanılmaktadır. Bu polimerler seçilirken; biyoyumlu ve istenilen mekanik özellikleri yerine getirecek şekilde olmasına dikkat edilmelidir (Kumar vd., 2003; Tiwari ve Siahboomi, 2008).

4.7. Hücre Canlılık Testleri

4.7.1. MTT testi

MTT sarı renkli bir formazan tuzudur. Proliferasyona uğrayan hücrelerin artan mitokondriyel dehidrojenaz enzim aktivitesi MTT'yi mor renkli suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüşmesine sebep olur. Bu kristaller dimetil sülfoksit (DMSO)'da veya izopropil alkolde çözünür. Hücre canlılığını tespit etmek için spektrofotometrik analiz gerçekleştirilir. Hücre kontrol grubu hücrelerinin canlılığı %100 kabul edilir. Uygulama yapılan hücrelerin canlılığı hücre kontrol grubu ile karşılaştırılarak yüzde (%) canlılığı belirlenir (Erkekoglu ve Baydar 2021).

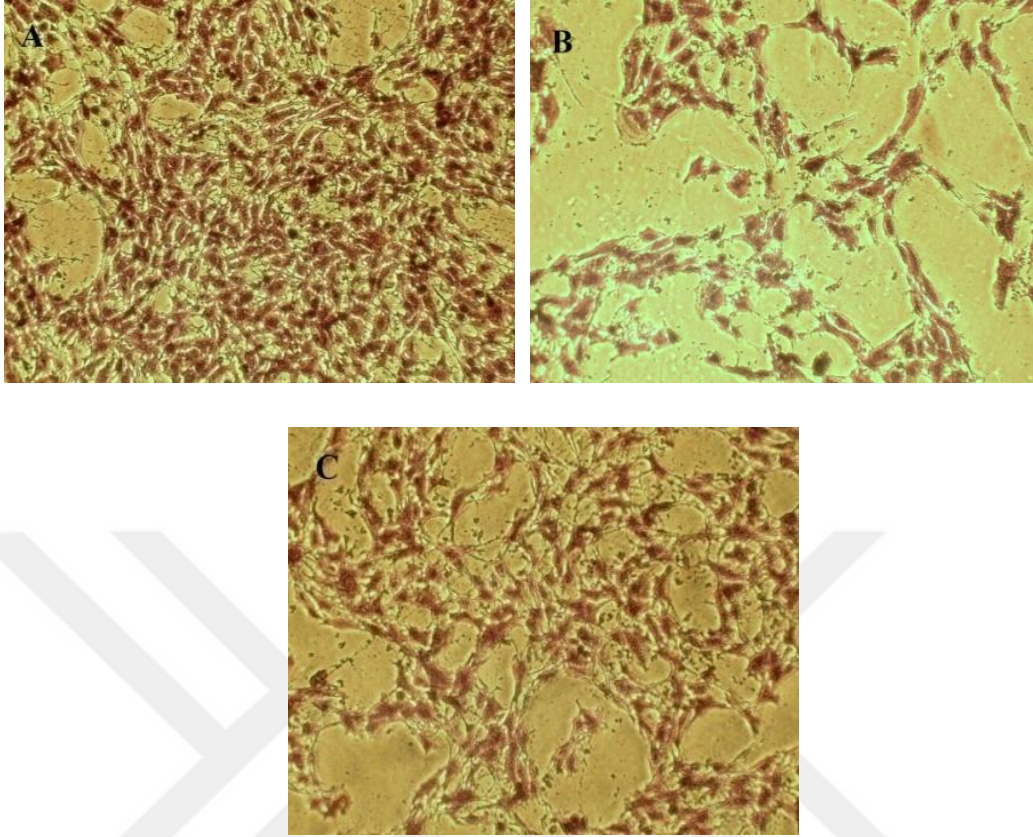
0,01 mg/ml derişiminde MLN4924, 0,01mg/ml derşiminde ilaç yüklü selüloz esaslı taşıyıcı ve sadece selüloz esaslı taşıyıcı uygulama gruplarının hücre sitotoksosite belirleme çalışmaları MTT testi ile değerlendirilmiştir. Örnekler UV ışığında sterilize edildikten sonra sitotoksitesinin belirlenmesi için, %80 yoğunluğa ulaşmış U87 hücreleri kullanılarak her kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde MTT testi gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen MTT testi sonucunda, sadece selüloz esaslı taşıyıcı uygulanan grupta sitotoksik etki yaklaşık %27 olarak görülmektedir. 0,01mg/ml konstantrasyonda MLN4924 uygulaması ve selüloza taşıyıcıya yüklü MLN4924 uygulaması arasındaki değerler karşılaştırılmıştır. Bu değerlere göre 72 saat sonunda MLN4924 yüklü selüloz esaslı taşıyıcı grubundaki hücrelerin ölüm oranı %96 iken, serbetst MLN4924 uygulanan grubun ölüm oranı ise %99'dur. Sitotoksik etkisi yüksek olan antikanser ajanların taşıyıcı salım sistemleri uygulamalarının bu tür ilaçların sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkisini azaltmada, avantaj sağladığı bilinmektedir (Akal vd., 2022). Böylece vücut için sitotoksik etki azaltılarak ilacın etki süresi ve etki oranı artırılabilir. Kontrollü salım sistemlerinin, enkapsüle veya immobilize edilmiş etken maddelerin, enzimatik-enzimatik olmayan, fiziksel, kimyasal değişimlere ve degradasyonuna karşı yüksek stabilite sağladığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada serbest MLN4950'nin 48. saatte etkileri gözlemlenmiştir (Chen vd. 2024). Çalışmamızda 24 ve 48 saat MTT sonuç grafiği aşağıda belirtilmiştir (Şekil 21 .)



Şekil 21. 24 ve 48 Saat Sonunda MLN4924'ün Apoptotik Etkisinin MTT Testi Grafiği

4.7.2.Kristal viyole boyama

Kristal viyole boyama canlı, adheren hücrelerin protein ve DNA'larına bağlanarak görüntü veren bir maddedir. Ölen hücrelerin adheren özelliklerini yitirir (Erkekoglu ve Baydar 2021). Böylelikle bu hücrelerdeki protein ve DNA'ya bağlanamaz. Sonuç olarak renk şiddetindeki azalma ile canlı / ölü hücre ayrımının gözlemlenmesine olanak sağlar. Kristal viyole ile hücre canlılık testleri sonuçları hücrelerin 24 saat sonunda değerlendirilmiştir. Hücrelerin, MLN4924 yüklü selüloz esaslı taşıyıcılarla muamelesi sonucunda veriler elde edilmiştir. Elde edilen görüntüler şekil 22 de verilmiştir. U87'ler üzerinde gerçekleştirilen kristal viyole boyama uygulaması sonucunda, selüloz esaslı taşıyıcıların hücreler üzerinde sitotoksik bir etkisi olmadığı, ilaç yüklü selüloz esaslı taşıyıcıların ise hücre canlılığına önemli etkileri olduğu gözlemlenmiştir.

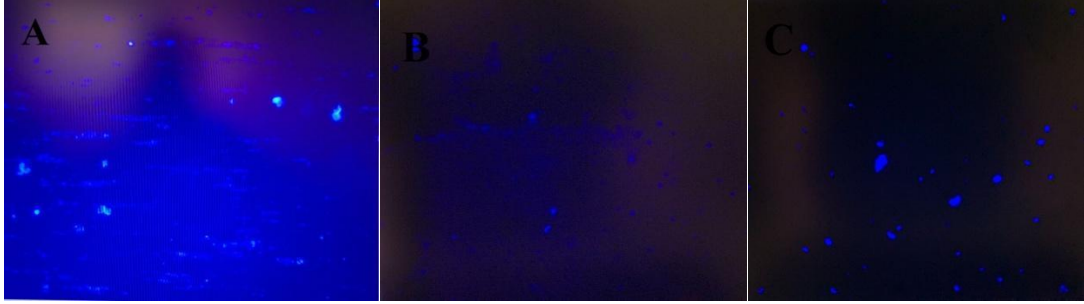


Şekil 22. MLN4924 yüklü selüloz esaslı taşıyıcıların hücre uygulamasının kristal viyole boyama ile boyama sonrası alınan görüntüleri A) 0,01mg/ml derişiminde MLN4924 uygulanan hücreler B) MLN4924 yüklü selüloz esaslı taşıyıcı uygulanan hücreler C) Kontrol grubu hücreleri

4.7.3.Florasan mikroskobu ile apoptoz tayini

MLN4924'ün salımının 38 saat sonunda salımı tamamladığı göz önünde bulundurularak U87 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen çalışma sonucunda floresan mikroskobu ile hücre canlılık tayini gerçekleştirilmiştir. Çalışma da 24 saat sonunda floresan mikroskop ile yapılan çalışmada kullanılan DAPI, deforme olmamış hücre zarından geçerek nükleusu boyamasından dolayı canlı hücreleri gözlemlemek için kullanılır. Bu amaçla, üç konsantrasyonda gerçekleştirilen ilaç uygulaması, ilaç yüklenmiş selüloz esaslı taşıyıcı, sadece selüloz esaslı taşıyıcı ve işlem görmemiş hücre kontrol grupları incelenmiştir. Selüloz esaslı taşıyıcıların tek başına hücre canlılığını etkilememesi sitotoksik olmadığını göstermiştir. İlaç adsorbe edilen

selüloz esaslı taşıyıcı ile muamele edilen hücre grubunda canlılık oranı %38 olarak, 0,01mg/ml konsantrasyonda ilaç uygulanan grupta canlılık oranı %30 olarak hesaplanmıştır. Bu verilere dayanarak selüloz esaslı taşıyıcıya yüklenen ilaç uygulamasında başarılı sonuç elde edildiği belirlenmiştir.



Şekil 23. MLN4924 yüklü selüloz esaslı taşıyıcıların hücre uygulamasının floresan mikroskopu görüntüleri A) 0,01mg/ml derişiminde MLN4924 uygulanan hücreler B) MLN4924 yüklü selüloz esaslı taşıyıcı uygulanan hücreler C) Kontrol grubu hücreleri

Bu çalışma kapsamında selüloz esaslı taşıyıcı, atık pamuktan rejenere selüloz eldesini takiben, selüloz kristallerin sülfürik asit hidroliz yöntemi ile hidrolizi sonucu 0,4- 1,5 µm boyutlarda elde edildi. Elde edilen selüloz esaslı taşıyıcıların sodyum periyodat oksidasyon yöntemi ile modifikasyonu sonrası yükleme çalışmaları adsorpsiyon yöntemi ile gerçekleştirildi %50 oranında verim ile MLN4924 yüklü selüloz esaslı taşıyıcı elde edildi. İlaç salım çalışmaları kapsamında MLN4924 yüklü selüloz esaslı taşıyıcıdan ilacın yaklaşık 48 saat sonunda salımının tamamlandığı gözlemlendi. Sitotoksitesite çalışmalarında hazırlanan taşıyıcıyı sitotoksitesitesinin oldukça düşük olduğu (%0,5-17,1) buna karşın hazırlanan MLN4924 yüklü selüloz esaslı taşıyıcının ise U87 hücre hattı üzerinde (%92) oldukça etkili olduğu görüldü. Apoptoz görüntüleme çalışmalarında floresan mikroskopu kullanılarak canlı hücreler görüntülenmiştir. İlaç yüklü selüloz esaslı taşıyıcı ile muamele edilen hücre çalışmalarında canlılık oranı %38 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak MLN4924 yüklü selüloz esaslı taşıyıcılarla gerçekleşen çalışmada U87 hücre hattında apoptozu indüklediğini ve çalışmanın başarı ile gerçekleştirildiğini gösterdi. Elde edilen verilerin literatüre bilgi olarak destek sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akal M., Demirdere M.E., ve Ünlü D., 2022. “Anti-kanser ilacı 5-Fluorourasil’in bentonit yüklü kitosan/hidroksipropil metilselüloz biyonanokompozit filmlerden kontrollü salımı”. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*: 1–10.
- Aubry A., Yu, T., ve Bremner R. (2020). Preclinical Studies Reveal Mln4924 Is A Promising New Retinoblastoma Therapy. *Cell Death Discovery*, 6(1)
- Aydın Ö., ve Ünlüel İ., 2022. “Enkapsülasyon Teknikleri ve Kontrollü Salım”. *European Journal of Science and Technology* (32): 640–48.
- Bahjat M., De Wilde G., Van Dam T., Maas C., Bloedjes T., Bende R. J., Van Noesel C. J. M., Luijckx D. M., Eldering E., Kersten M. J., ve Guikema J. E. J. (2019). The Ned8-Activating Enzyme Inhibitor Mln4924 Induces Dna Damage In Ph+ Leukemia And Sensitizes For Abl Kinase Inhibitors. *Cell Cycle*, 18(18), 2307–2322
- Bilek S., Yalçın M. A., ve Cesur S. (2019). Tarımsal Atıklardan Selüloz Nanokristallerinin Eldesi, Karakteristik Özellikleri Ve Uygulama Alanları. *Akademik Gıda*, 17(1), 140–148.
- Bryukhovetskiy I., & Shevchenko V. (2016). Molecular Mechanisms Of The Effect Of Tgf-B1 On U87 Human Glioblastoma Cells. *Oncology Letters*, 12(2), 1581–1590. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4756>
- Burz C., Berindan-Neagoe I., Balacescu, O., ve Irimie A. (2009). Apoptosis In Cancer: Key Molecular Signaling Pathways And Therapy Targets. *Acta Oncologica*, 48(6), 811–821.
- Chen, Y. N., Chan, Y. H., Shiau, J. P., Farooqi, A. A., Tang, J. Y., Chen, K. L., ... ve Chang, H. W. (2024). The neddylation inhibitor MLN4924 inhibits proliferation and triggers apoptosis of oral cancer cells but not for normal cells. *Environmental Toxicology*, 39(1), 299-313.
- Cheng, W., Zhu, Y., Jiang, G., Cao, K., Zeng, S., Chen, W., ... ve Yu, H. (2023). Sustainable cellulose and its derivatives for promising biomedical applications. *Progress in Materials Science*, 101152.
- Chung D., ve Deldaire, G. (2015). The role of the COP9 signalosome and neddylation in DNA damage signaling and repair. *Biomolecules*, 5(4), 2388-2416.
- De Souza Lima M., ve Borsali R. (2004). Rodlike Cellulose Microcrystals: Structure, Properties, And Applications. *Macromolecular Rapid Communications*, 25(7), 771–787. <https://doi.org/10.1002/Marc.200300268>
- Dinçel G. Ç., ve Kul O. (2016). Patolojik apoptozis ve tanı yöntemleri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(1), 86-108.
- Dinçer, Ahmet Emre, Selda Cansu Temel, ve Sebile Merve Öztürk. 2021. “Düzce Üniversitesi Bilim ve

- Teknoloji Dergisi". *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi* 9(1): 278–92. Ekinci M., ve Özdemir D. I. (2021). Nanoteranostikler. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 45(1), 131–155.
- Enzyme N., Mln4924 I., Wong K. M., Micel L. N., Selby H. M., Tan A. C., Pitts T. M., Bagby S. M., Spreafico A., Klauck P. J., Blakemore S. J., Peter F., Mcdonald A., Berger A., Tentler J. J., & Eckhardt S. G. (2018). *Hhs Public Access*. 35(1), 11–25.
- Ergin, Irem, ve Hadi Alihosseini. 2009. "Trichoblastoma Benign Adnexal Tumor in The Dog Trichoblastoma Benign Adnexal Tumor in The Dog". (February 2015).
- Erkekoglu P., ve Terken B., 2021. "Güncel In Vitro Sitotoksikite Testleri (Current In Vitro Cytotoxicity Tests)". 41(1): 45–63.
- Eröz, R., Karata\Cs, A., Alkoç, O. A., Baltacı, D., Oktay, M., & Çolako\Uglu, S. (2012). Apoptozis Hakk\Nda Bilinenler (Literat\Ü}R Taramas\İ}). *Duzce Medical Journal*, 14(2), 87–101.(Fathi, 2018)
- Fejzullahu, A. (2021). *Metastatik Meme Kanseri Tedavisinde Nf - Kb Sinyal*.
- Foster J. H., Barbieri E., Zhang L., Scorsone K. A., Moreno-Smith M., Zage P., ve Horton T. M. (2021). The Anti-Tumor Activity Of The Nedd8 Inhibitor Mln4924 İn Neuroblastoma. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(12).
- Güleş Ö., ve Eren Ü. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 73-78.
- Gülsu A., ve Yüksektepe E. (2021). Preparation Of Gentamicin Conjugated Cellulose Nanocrystals And Evaluation Of Efficacy On Different Microorganisms. *European Journal Of Science And Technology*, 27, 1105–1112.
- Gong J., Hou L., Ching Y. C., Ching K. Y., Hai N. D., & Chuah, C. H. (2024). A Review Of Recent Advances Of Cellulose-Based İntelligent-Responsive Hydrogels As Vehicles For Controllable Drug Delivery System. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 264(P2), 130525. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130525>
- Gorska M., Popowska U., Sielicka-Dudzin A., Kuban-Jankowska A., Sawczuk, W., Knap N., Cicero G., Bucchieri F., ve Wozniak M. (2011). Geldanamycin And İts Derivatives As Hsp90 İnhibitors. *Frontiers İn Bioscience*, 17(6), 2269–2277.
- Hajba-Horváth E., Biró E., Mirankó M., Fodor-Kardos A., Trif L., ve Feczko T. (2020). Preparation And: In Vitro Characterization Of Valsartan-Loaded Ethyl Cellulose And Poly(Methyl Methacrylate) Nanoparticles. *Rsc Advances*, 10(72), 43915–43926.
- Heng Paul W.S. 2018. "Controlled release drug delivery systems". *Pharmaceutical Development and Technology* 23(9): 833.

- Karakoç, Z., KETANİ, M. A., & Ketani, Ş. (2016). Mikroskopların çalışma mekanizması ve çeşitleri. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1), 1-6.
- Kobayashi A., Kang M. I., Okawa H., Ohtsuji M., Zenke Y., Chiba T., ...ve Yamamoto M. (2004). Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions As An Adaptor For Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation Of Nrf2. *Molecular And Cellular Biology*, 24(16), 7130-7139.
- Koczurkiewicz P., Kłaś K., Grabowska K., Pisk, K., Rogowska K., Wójcik-Pszczola K., Podolak I., Galanty A., Michalik M., ve Pękala E. (2019). Saponins As Chemosensitizing Substances That Improve Effectiveness And Selectivity Of Anticancer Drug—Minireview Of In Vitro Studies. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2141–2151.
- Kong T., Laranjeira A. B. A., Collin, T. B., De Togni E. S., Wong, A. J., Fulbrigh
- Liu, A., Wu, H., Naeem, A., Du, Q., Ni, B., Liu, H., ve Ming L. (2023). Cellulose nanocrystalline from biomass wastes: An overview of extraction, functionalization and applications in drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124557.
- Luo Z., Pan Y., Jeong L. S., Liu J., ve Jia L. (2012). Inactivation Of The Cullin (Cul)-Ring E3 Ligase By The Nedd8-Activating Enzyme Inhibitor Mln4924 Triggers Protective Autophagy In Cancer Cells. *Autophagy*, 8(11), 1677–1679.
- Luo Z., Yu G., Lee H. W., Li L., Wang L., Yang, D., ve Jia, L. (2012). The Nedd8-Activatin
- Enzyme Inhibitor Mln4924 Induces Autophagy And Apoptosis To Suppress Liver Cancer Cell Growth. *Cancer Research*, 72(13), 3360-3371.
- Massagué Joan. 2008. “TGFβ in Cancer”. *Cell* 134(2): 215–30
- M. C., Ruzinova, M., Celik, H., Challen, G. A., Fisher, D. A. C., & Oh, S. T. (2022). Mln4924 Targets Malignant Cells In Myeloproliferative Neoplasms In Vitro And In Vivo Via Nfkb Pathway Inhibition. *Blood Advances*, 6(2), 611–623.
- Malhab L. J. B., Descamps S., Delaval B., ve Xirodimas D. P. (2016). The Use Of The Nedd8 Inhibitor Mln4924 (Mln4924) In A Cyclotherapy Approach To Protect Wild-Type P53 Cells From Mln4924 Induced Toxicity. *Scientific Reports*, 6(August), 1–10.
- Md Yusof, E. N., M. Latif, M. A., M. Tahir, M. I., Sakoff, J. A., Simone, M. I., Page, A. J., ... & BSA Ravoof, T. (2019). o-Vanillin derived schiff bases and their organotin (IV) compounds: synthesis, structural characterisation, in-silico studies and cytotoxicity. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 854.
- Neumann S., Shirley S. A., Kemp R. A., ve Hook S. M. (2016). Improved Antitumor Activity Of A Therapeutic Melanoma Vaccine Through The Use Of The Dual

Cox-2/5-Lo İnhibitor Licofelone. *Frontiers In Immunology*, 7(Dec), 1–11.

Nikolic T., Kostic M., Praskalo J., Pejic B., Petronijevic Z., ve Skundric P. (2010). Sodium Periodate Oxidized Cotton Yarn As Carrier For Immobilization Of Trypsin. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 976–981.

Nomura M., Nomura N., Newcomb E. W., Lukyanov Y., Tamasdan C., ve Zagzag D. (2004). Geldanamycin İnduces Mitotic Catastrophe And Subsequent Apoptosis İn Human Glioma Cells. *Journal Of Cellular Physiology*, 201(3), 374–384

Özkoç M., Özbal B. S., ve Altundağ, E. M. (2022). Sisplatin ve Timokinon Kombinasyonunun MCF-7 Hücrelerindeki Antiproliferatif Etkisinin Değerlendirilmesi. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 15(3), 348-355.

Özçelik Erdal, M. S., ve Özsoy, Y. (2022). KONTROLLÜ İLAÇ SALIMINDA SON TEKNOLOJİLER. *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, 5(2), 122-129. Sabbadini, Fabio vd. 2021. “The multifaceted role of TGF- β in gastrointestinal tumors”. *Cancers* 13(16): 1–24.

Sadri A., Changizi V. ve Eivazadeh. N., 2015. “Evaluation of glioblastoma (U87) treatment with ZnO nanoparticle and X-ray in spheroid culture model using MTT assay”. *Radiation Physics and Chemistry* 115: 17–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.05.035>.

Sasnauskiene A., Kadziauskas J., Vezelyte N., Jonusiene V., ve V. (2009). Apoptosis, Autophagy And Cell Cycle Arrest Following Photodamage To Mitochondrial Interior. *Apoptosis*, 14(3), 276–286.

Saxena I. M., ve Brown R. M. (2005). Cellulose Biosynthesis: Current Views And Evolving Concepts. *Annals Of Botany*, 96(1), 9–21.

Shi C.-S., Kuo, K.-L., Lin W.-C., Chen M.-S., Liu S.-H., Liao, S.-M., Hsu C.-H., Chang, Y.-W., Chang H.-C., ve Huang, K.-H. (2020). Neddylation İnhibitor, Mln4924 Suppresses Angiogenesis İn Huvecs And Solid Cancers: İn Vitro And İn Vivo Study. *American Journal Of Cancer Research*, 10(3), 953–964. <Http://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Pubmed/32266102%0ahttp://Www.Pubmedcentral.Nih.Gov/Articlerender.Fcgi?Artid=Pmc7136913>

Soucy T. A., Smith, P. G., Milhollen, M. A., Berger, A. J., Gavin, J. M., Adhikari, S., Brownell, J. E., Burke K. E., Cardin D. P., Critchley S. Cullis, C. A., Doucette, A., Garnsey, J. J., Gaulin, J. L., Gershman, R. E., Lublinsky, A. R., Mcdonald, A., Mizutani H., Narayanan U., ... Langston S. P. (2009). An İnhibitor Of Nedd8-Activating Enzyme As A New Approach To Treat Cancer. *Nature*, 458(7239), 732–736. <Https://Doi.Org/10.1038/Nature07884>

Sümer-turanlıgil, N. C. (2010). Hücre içi sinyal yolları ve klinik yansımaları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 19(3), 180-191.

Tajima H., Ohta, T., Kitagawa, H., Okamoto K., Sakai, S., Kinoshita J., .. ve Tsuneyama, K. (2012). Neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine for pancreatic cancer increases in situ expression of the apoptosis marker M30 and stem cell marker CD44. *Oncology Letters*, 3(6), 1186-1190.

Tavolari S., Munarini A., Storci G., Laufer S., Chieco P., ve Guarnieri, T. (2012). The Decrease Of Cell Membrane Fluidity By The Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Licofelone İnhibits Epidermal Growth Factor Receptor

- Signalling And Triggers Apoptosis In Hca-7 Colon Cancer Cells. *Cancer Letters*, 321(2), 187–194.
- Tong S., Si Y., Yu H., Zhang L., Xie, P., & Jiang, W. (2017). Mln4924 (Mln4924), A Protein Neddylation Inhibitor , Suppresses Proliferation And Migration Of Human Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Scientific Reports*, June, 1–9.
- Topel S. D., Balcioglu S., Ateş B., Asilturk M., Topel Ö., ve Ericson, M. B. (2021). Cellulose Acetate Encapsulated Upconversion Nanoparticles – A Novel Theranostic Platform. *Materials Today Communications*, 26(October 2020).
- Tüylek Z., 2017. “İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER VE NANOTEKNOLOJİK ETKİLEŞİM Drug Delivery Systems and Nanotechnological Interactionfile”. *Bozok Tıp Dergisi* 7(3): 89–98.
- Wanner, E., Thoppil, H., & Riabowol, K. (2021). Senescence and apoptosis: architects of mammalian development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 620089.
- Wolenski, F. S., ve Y. P. Dragan. 2015. “Understanding drug-cytokine synergistic toxicity”. *Cell Death and Disease* 6(11): e1988-2. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.321>.
- Yu, L., Zhu, G., Zhang, Z., Yu, Y., Zeng, L., Xu, Z., ... & Pathak, J. L. (2023). Apoptotic bodies: bioactive treasure left behind by the dying cells with robust diagnostic and therapeutic application potentials. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1), 218.
- Wan Y., Luo Z., Pan Y., Wang W., Zhou X., Jeong L. S., Chu Y., Liu, J., ve Jia L. (2015). Targeting Protein Neddylation With An Nedd8-Activating Enzyme Inhibitor Mln4924 Induced Apoptosis Or Senescence In Human Lymphoma Cells. *Cancer Biology And Therapy*, 16(3), 420–429.
- We L. Y., Wu Z. X., Yang, Y., Zhao M., Ma X. Y., Li J. S., Yang D. H., Chen Z. S., ve Fan Y. F. (2020). Overexpression Of Abcg2 Confers Resistance To Mln4924, An Nae Inhibitor. *Experimental Cell Research*, 388(2), 111858
- Wong K. M., Micel L. N., Selby H. M., Tan A. C., Pitts T. M., Bagby, S. M., Spreafico A., Klauck P. J., Blakemore S. J., Smith P. F., Mcdonald A., Berger A., Tentler, J. J., & Eckhardt, S. G. (2017). Targeting The Protein Ubiquitination Machinery In Melanoma By The Nedd8-Activating Enzyme Inhibitor Mln4924 (Mln4924). *Investigational New Drugs*, 35(1), 11–25.
- Wolenski F. S., ve Y. P. Dragan. 2015. “Understanding drug-cytokine synergistic toxicity”. *Cell Death and Disease* 6(11): e1988-2. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.321>.
- Wolenski F. S., Fisher C. D., Sano T., Wyllie, S. D., Cicia L. A., Gallacher M. J., Baker R. A., Kirby P. J., & Senn, J. J. (2015). The Nae Inhibitor Mln4924 (Mln4924) Synergizes With Tnf-A To Activate Apoptosis. *Cell Death Discovery*, 1(1), 1–9.
- Wu M. H., Lee C. Y., Huang T. J., Huang K. Y., Tang C. H., Liu S. H., Kuo K. L., Kuan F. C., Lin W. C., ve Shi, C. S. (2019). Mln4924, A Protein Neddylation Inhibitor, Suppresses The Growth Of Human Chondrosarcoma Through Inhibiting Cell Proliferation And Inducing Endoplasmic Reticulum Stress-Related Apoptosis. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(1).

<https://doi.org/10.3390/ijms20010072>

- Xu X. H., Li T., Fong C. M. V., Chen X., Chen X. J., Wang Y. T., Huang M. Q., ve Lu, J. J. (2016). Saponins From Chinese Medicines As Anticancer Agents. *Molecules*, 21(10), 1–27.
- Xu J., Li Z., Zhuo Q., Ye Z., Fan G., Gao H., Ji S., Yu X., Xu, X., Liu W., ve Xu W. (2022). Mln4924 Suppresses Pancreatic Cancer Growth Via Inactivation Of The Neddylation Pathway. *Frontiers In Oncology*, 12(January), 1–12.
- Yao W. T., Wu J. F., Yu G. Y., Wang R., Wang, K., Li, L. H., Chen P., Jiang Y. N., Cheng H., Lee, H. W., Yu J., Qi, H., Yu X. J., Wang, P., Chu, Y. W., Yang M., Hua Z. C., Ying, H. Q., Hoffman R. M., ... Jia L. J. (2014). Suppression Of Tumor Angiogenesis By Targeting The Protein Neddylation Pathway. *Cell Death And Disease*, 5(2), 1–12.
- Yu, L., Zhu, G., Zhang, Z., Yu, Y., Zeng, L., Xu, Z., ... & Pathak, J. L. (2023). Apoptotic bodies: bioactive treasure left behind by the dying cells with robust diagnostic and therapeutic application potentials. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1), 218.
- Yusof E. N. M., Latif, M. A. M., Tahir, M. I. M., Sakoff, J. A., Simone, M. I., Page, A. J., Veerakumarasivam, A., Tiekink, E. R. T., & Ravoof, T. B. S. A. (2019). O-Vanillin Derived Schiff Bases And Their Organotin(IV) Compounds: Synthesis, Structural Characterisation, In-Silico Studies And Cytotoxicity. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(4). <https://doi.org/10.3390/ijms20040854>
- Zhang Y., Shi C., Yin L., Zhou W., Wang H., Seng J., ve Li W. (2017). Inhibition Of Mcl-1 Enhances Mln4924-Triggered Apoptosis In Osteosarcoma Cells. *Experimental Cell Research*, 358(2), 234–241
- Zhou L., Chen S., Zhang Y., Kmiecik M., Leng Y., Li, L., Lin H., Rizzo K. A., Dumur C. I., Ferreira-Gonzalez A., Rahmani M., Povirk L., Chalasani S., Berger A. J., Dai Y., ve Grant S. (2016). The Nae Inhibitor Mln4924 Interacts With The Hdac Inhibitor Belinostat To Target Aml Cells By Disrupting The Ddr. *Içinde Blood* (C. 127, Sayı 18)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad: E**** Y*****

Uyruk: T.C

Doğum Tarihi: 2*/0*/199*

Medeni Hali: Bekar

Telefon: * *** ** * ** *

E-posta: e*****@gmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Fatih Anadolu Lisesi	2015
Lisans	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi	2020
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2024

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2020	İzmir Medikalpark Hastanesi	IVF Biyolog

Yabancı Dil(ler)

Dil (İngilizce, vs)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma	X		
Anlama		X	
Okuma		X	

Bilimsel Faaliyetler

Bildiri

**ABANT 3. Uluslar arası Güncel Akademik Çalışmalar Sempozyumu -
(Sözlü Bildiri).**

Projeler

123Z133 no'lu proje TÜBİTAK 1002-B Acil Destek Programı

Hobiler

1. Müzik dinlemek
2. Spor yapmak
3. Yeni yerler keşfetmek
4. Kitap okumak