

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLİOBLASTOMA TEDAVİSİNDE
KULLANILMAK ÜZERE ROSMARİNİK
ASİT YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN
SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE *IN*
VITRO ANALİZİ

Zülfiye SERCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Ayşegül ERDEMİR

Ocak, 2025

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLİOBLASTOMA TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE
ROSMARİNİK ASİT YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN
SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE *IN VITRO* ANALİZİ**

Zülfiye SERCAN tarafından hazırlanan tez çalışması 17.01.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ayşegül ERDEMİR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ayşegül ERDEMİR, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Şule Nur KARAVUŞ, Üye

İstanbul Medipol Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Ayşegül ERDEMİR sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Glioblastoma Tedavisinde Kullanılmak Üzere Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve *İn Vitro* Analizi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Zülfiye SERCAN

İmza



Bu çalışma, “Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü’nün 6058” numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu çalışma, TÜBİTAK 2210-A Yurt İçi Yüksek Lisans bursuyla desteklenmiştir.



*Aileme
ve
eşime*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleriyle bana yol gösterici ve destek olan ilgisini ve önerilerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ayşegül ERDEMİR'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerim boyunca hem fiziksel hem de manevi desteğiyle yanımda olan sevgili arkadaşım Cansu TATAR'a,

Koşuşturmalarının arasından her zaman vakit ayıran YTÜ'nün değerli araştırma görevlileri Fatma Şayan POYRAZ'a ve Emrah BERTAN'a,

Çalışmalarım boyunca yardımını hiç esirgemeyen değerli hocam Dr. Şulenur KARAVUŞ'a,

Çalışma hayatına 13 yaşında Burçin Eczanesi'nde adım atan o zamanki kendime ve bana her zaman ilham veren sevgili ilk işverenim Burçin KINACI'ya ve beni akademiye hazırlayan değerli eşi Prof. Dr. Ömer Kemal KINACI'ya,

Canım destekçim, motivasyon kaynağım her zaman yanımda bulunan sevgili Yasemin ŞEN'e, Destekleriyle bana moral olan sevgili arkadaşlarım Merve OKKAY ve Damlanur ÇOBAN'a, Erdemir Laboratuvar Grubu'ndan sevgili arkadaşlarım, Sudenur AFACAN'a, Tuğba ÇAVDAR'a, Zeynep BALKIR'a

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle desteklerini esirgemeyen YTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki tüm hocalarıma,

Maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili aileme; annem Keziban SERCAN'a, babam Recayi SERCAN'a, abim Uğur Caner SERCAN'a ve kardeşim Onurcan SERCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin varolması ve benim çalışmalarımı sürdürebilmem için maddi desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a, teşekkür ederim.

Zülfıye SERCAN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	5
1.3 Hipotez	5
2 GENEL KISIMLAR	6
2.1 Kanser	6
2.2 Glioblastoma	13
2.2.1 Glioblastoma Tedavisi	15
2.3 Fenolik Bileşikler	17
2.3.1 Kanserde Fenolik Asitler	18
2.3.2 Rosmarinik Asit	20
2.4 İlaç Taşıyıcı Sistemler	23
2.4.1 Nanopartiküller	26
2.4.2 Polimerik Nanopartikül	27
2.4.3 Glioblastoma Tedavisinde Polimerik Nanopartiküller	29

3 MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.2 Materyal	32
3.2.1 Kullanılan Cihazlar.....	32
3.2.2 Kullanılan Sarf Malzemeler	33
3.2.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
3.2.4 Kullanılan Solüsyonlar ve Tamponlar	35
3.2.5 Farklı Konsantrasyonlardaki Rosmarinik Asit Çözeltileri.....	36
3.3 Yöntem.....	37
3.3.1 Rosmarinik Asit İçin UV-Vis Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması 37	
3.3.2 Rosmarinik Asit İçeren PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi: O/W Emülsiyon Çözücü Uçurma Yöntemi	38
3.3.3 Rosmarinik Asit Taşıyan Nanopartiküllerin Reaksiyon Verimliliği, Yükleme Etkinliği ve Enkapsülasyon Etkinliği Değerlendirilmesi .	39
3.3.4 Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	40
3.3.5 Rosmarinik Asit Nanopartiküllerin <i>İn Vitro</i> Salımı.....	41
3.3.6 U87MG İnsan Glioblastoma Hücre Kültürü Çalışmaları	42
3.3.7 Rosmarinik Asit İçeren Nanopartiküllerin <i>İn Vitro</i> Biyolojik Etkilerinin İncelenmesi	46
4 SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	55
4.1 Rosmarinik Asidin UV-Spektral Davranışı ve Kalibrasyon Eğrilerinin Değerlendirilmesi	55
4.2 Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin Sentez Çalışması	58
4.3 RANP'lerin Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Etken Madde Yükleme Kapasitesi	60
4.3.1 Nanopartikül Reaksiyon Verimliliği (RV) Hesaplanması	62
4.3.2 Etken Madde Yüklenme Verimi (Drug Loading, DL).....	62
4.3.3 Enkapsülasyon Etkinliği.....	63

4.4 Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyon Sonuçları	64
4.4.1 Nanopartiküllerin Boyut Profili ve Çoklu Dağılım İndeksi (PDI) Analizlerinin Değerlendirilmesi	64
4.4.2 Nanopartiküllerin Elektriksel Yüzey Yükü Potansiyelinin (Zeta Potansiyeli) İncelenmesi	66
4.4.3 Nanopartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	67
4.4.4 Nanopartiküllerin Fonksiyonel Gruplarının FT-IR Spektroskopisi ile İncelenmesi	68
4.5 Nanopartiküllerin <i>In Vitro</i> Salım Profili ve Değerlendirilmesi.....	70
4.6 Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin U87MG İnsan Glioblastoma Hücre Hattı Üzerindeki <i>In Vitro</i> Aktiviteleri.....	72
4.6.1 Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücrelerinde Sitotoksik Aktivitesinin Değerlendirilmesi	73
4.6.2 Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücreleri Üzerindeki Hücre Göçü Etkisi.....	74
4.6.3 Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin U87MG İnsan Glioblastoma Hücre Hattı Üzerinde Apoptozis Tespiti İçin DAPI Boyama	77
4.6.4 Rosmarinik Asit'in U87MG İnsan Glioblastoma Hücre Hattı Üzerinde Apoptoz İndüksiyonun Gen Düzeyinde Gösterimi	78
5 SONUÇ.....	82
KAYNAKÇA	94
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	107

SİMGELİSTESİ

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

KISALTMA LİSTESİ

ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Attenuated Total Reflectance
BF	Büyüme Faktörü
BSA	Bovine serum albümin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCM	Diklorometan
DL	Etken Madde Yüklenme Verimi
DMEM	Dulbecco's Medified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EtOH	Etanol
EtOAc	Etil Asetat
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Fourier Transform Infrared
GA	Glikolik asit
GBM	Glioblastoma Multiforme
GDP	Guanozin difosfat
GTP	Guanosin-5'-trifosfat
HCl	Hidroklorik asit
IC ₅₀	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
KBB	Kan-Beyin Bariyeri
LA	Laktik asit
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NaCl	Sodyüm Klorür
NaOH	Sodyüm Hidroksit

NP	Nanopartikül
OD	Optik Yoğunluk
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDI	Çoklu Dağılım İndeksi
PGA	Poliglikolik asit
PIP3	Fosfatidilinositol (3-5)-trisfosfat
PKC	Protein kinaz C
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asit
Ppi	Proteaz fosfotaz inhibitörü
PTEN	Protein Tirozin Fosfataz ve Tensin Homoloğu
PTK	Tirozin kinaz
PVA	Polivinil alkol
RA	Rosmarinik asit
RANP	Rosmarinik asit yüklü nanopartikül
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RV	Reaksiyon Verimi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
UV	Ultra Violet
qRT-PCR	Gerçek zamanlı kantitatif PCR

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1	Kanser hücrelerinin temel altı ayırt edici özelliği .	8
Şekil 2. 2	Hücre içi sinyal iletim yolları; burada farklı renkli alanlarda gösterilen ayrı alt devreler, kanserin gelişiminde dört ana hücresel yol ve sinyal iletim ağı kritik rol oynar, hareketlilik devresi (motility circuits), çoğalma devresi (proliferation circuits), hayatta kalma devresi (viability circuits) ve sitostaz ve farklılaşma devresi (cytostasis and differentiation circuits)	10
Şekil 2. 3	Hücre döngüsünün aşamaları ve siklin-CDK ilişkisi.	11
Şekil 2. 4	Üç kritik sinyal yolunda sık görülen genetik değişiklikler.	14
Şekil 2. 5	Rosmarinik asit kimyasal yapı gösterimi	20
Şekil 2. 6	Nanoteknoloji ile ilaç taşıma sistemleri: nanotaşıyıcı türleri	25
Şekil 2. 7	L-PLA (A), D-PLA(B), PGA(C), PLGA (D)'nın kimyasal yapıları x; Laktik asit üniteleri sayısını, y; glikolik asit ünitelerinin sayısını göstermektedir.	28
Şekil 2. 8	PLGA hidrolizi	29
Şekil 4. 1	Rosmarinik asitin etil asetata karşı UV-Vis spektrumu	56
Şekil 4. 2	Rosmarinik asitin etil asetata karşı hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.	56
Şekil 4. 3	Rosmarinik asitin etil alkole karşı UV-Vis spektrumu	57
Şekil 4. 4	Rosmarinik asitin etil alkole karşı hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.	57
Şekil 4. 5	RANP'nin boyut dağılım profili.	66
Şekil 4. 6	RANP'ye ait zeta potansiyel grafiği.	67
Şekil 4. 7	RANP'lerin 20.000x büyütme ile SEM analizi sonucu elde edilen morfolojik görüntüsü.	68
Şekil 4. 8	PLGA, RA ve RANP'nin FT-IR spektrumları	70
Şekil 4. 9	RANP'nin in vitro salım profili.	72
Şekil 4. 10	U87MG insan glioblastoma hücrelerinin invert mikroskop ile 10x objektif altında elde edilmiş mikrografik görüntüsü	72
Şekil 4. 11	RA'nın U87MG hücre canlılığına 48 saat süre ile etkisi	74
Şekil 4. 12	RA ve RANP'nin U87MG hücre göçüne etkisi	75
Şekil 4. 13	RA ve RANP'nin U87MG insan glioblastoma hücre hattında yara	

kapanma süreci üzerindeki etkilerinin yüzdesel gösterimi	76
Şekil 4. 14 RA ve RANP'nin 48 saatlik uygulama sonrası U87MG insan	
glioblastoma hücre hattında apoptozun DAPI boyaması ile 20x ve 40x	
büyütmelerde gösterimi, kırmızı oklar apoptotik hücreleri, yeşil oklar	
sağlıklı hücreleri göstermektedir	78
Şekil 4. 15 Bax, Bcl-2, kaspaz-3 (Cas-3), kaspaz-9 (Cas-9), kaspaz-8 (Cas-8) ve ...	
Sitokrom-c (Cyt-c), genlerinin kontrol grubuna karşı gösterdiği relatif	
ekspresyon değişimleri (NK;negatif kontrol, RA;rosmarinik asit,	
RANP; Rosmarinik asit yüklü nanopartikül).....	80



TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1 Fenolik bileşiklerin alt grupları ve örnekler	18
Tablo 2. 2 Rosmarinik asit'in özellikleri.....	21
Tablo 2. 3 Rosmarinik asidin farklı kanser hücre hatlarındaki etkileri.....	22
Tablo 2. 4 Kullanıma girmiş olan lipozom yapılı ilaçlar	26
Tablo 2. 5 İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerler	27
Tablo 3. 1 U87MG insan glioblastoma hücre hattının temel özellikleri	43
Tablo 3. 2 cDNA sentezi bileşenleri	50
Tablo 3. 3 cDNA sentez reaksiyon koşulları	50
Tablo 3. 4 qRT-PCR için hazırlanan reaksiyon karışımları ve kullanım miktarları	52
Tablo 3. 5 qRT-PCR analizinde uygulanan reaksiyon koşulları.....	52
Tablo 3. 6 qRT-PCR analizinde kullanılan hedef genlerin primer dizilimleri, ürün uzunlukları ve Tm değerleri.....	53
Tablo 4. 1 Nanopartikül optimizasyon parametreleri	59
Tablo 4. 2 Sentezlenen nanopartiküllerin fiziko-kimyasal özelliklerine ilişkin karakterizasyon parametreleri	61
Tablo 4. 3 Nanodrop spektrofotometrik ölçümleri ile elde edilen RNA..... konsantrasyonu ve saflık değerleri.....	79

Glioblastoma Tedavisinde Kullanılmak Üzere Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve *In Vitro* Analizi

Zülfiye SERCAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Ayşegül ERDEMİR

Fenolik bileşikler, antiproliferatif ve antioksidan özellikleri nedeniyle kanser tedavisi araştırmalarında büyük ilgi görmektedir. Hidroksisinamik asitler grubuna dahil olan bir kafeik asit esteri; rosmarinik asit (RA) adını biberiyeden (*Salvia rosmarinus linn.*) alır ve biberiye, adaçayı, nane, fesleğen gibi birçok bitki türünde doğal olarak bulunan bir fenolik bileşiktir. Apoptotik indüksiyon, hücre proliferasyonu, metastaz ve anjiyogenezin inhibisyonu gibi antikanser özelliklere sahiptir. Ancak, RA'nın hızlı metabolizması ve düşük biyoyararlanımı, terapötik etkinliğini sınırlamaktadır. Bu bağlamda, RA'nın biyoyararlanımını artırmak ve etkinliğini optimize etmek amacıyla, biyobozunur bir polimer olan PLGA (polilaktik-ko-glikolik asit) kullanılarak rosmarinik asit yüklü PLGA nanoparçacıkları (RANP) geliştirilmiştir.

Glioblastoma multiforme (GBM), primer beyin tümörlerinin %15'ini ve gliomaların %55'ini oluşturan, yetişkinlerde en sık görülen ve oldukça agresif bir

beyin tümörüdür. Ortalama sağkalım süresi 12-15 ay arasında değişmekte olup, kan-beyin bariyerinin (KBB) ilaç geçişini kısıtlayan etkisi tedaviyi güçleştirmektedir. Bu nedenle, KBB'yi aşabilecek yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, tekli emülsiyon (w/o) çözücü uçurma yöntemi kullanılarak sentezlenen RANP'lerin U87MG insan glioblastoma hücre hattı üzerinde hücre canlılığına, hücre göçüne ve apoptotoza olan etkileri incelenmiştir. Sentezlenen RANP'lerin ortalama boyutu $93,42 \pm 4,11$ nm, PDI değeri $0,115 \pm 0,017$, zeta potansiyeli $-42,1 \pm 5,4$ mV, reaksiyon verimi %69, enkapsülasyon etkinliği %37,5 ve yükleme verimi %0,05 olarak belirlenmiştir. MTT yöntemiyle belirlenen sitotoksik aktiviteye göre, RA'nın 48. saatteki IC_{50} 'si $9 \mu\text{g/ml}$ iken RANP'nin IC_{50} 'si $4,5 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Yara kapanma testinde, kontrol grubunda %100 olan yara kapanma oranı, RA ve RANP gruplarında sırasıyla %30 ve %35 olarak belirlenmiş, hücre göçünün baskılandığı görülmüştür. Gen ekspresyon analizlerinde, RANP uygulaması Bax gen ekspresyonunda 18,52 kat, Bcl-2 gen ekspresyonunda 13,9 kat ve sitokrom-c gen ekspresyonunda 6,025 kat artışa yol açmıştır. Buna karşın, RA uygulaması bu genlerin ekspresyonunda sırasıyla 1,64 kat, 6,04 kat ve 2,12 kat artış göstermiştir. RANP uygulamasındaki yüksek Bax/Bcl-2 oranı, mitokondriyal geçirgenliğin arttığını ve apoptotik sinyal yollarının aktifleştğini göstermektedir.

Sonuç olarak, RANP formülasyonu, RA'nın terapötik etkinliğini artırmış ve U87MG glioblastoma hücre hattında güçlü sitotoksik ve apoptotik etkiler göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Rosmarinik asit, glioma kanseri, glioblastoma, PLGA, apoptoz

ABSTRACT

Synthesis, Characterization and *In Vitro* Analysis Of Rosmarinic Acid Loaded Nanoparticles For Glioblastoma Treatment

Zülfiye SERCAN

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Doc. Dr. Ayşegül ERDEMİR

Phenolic compounds attract significant attention in cancer treatment research due to their antiproliferative and antioxidant properties. Rosmarinic acid (RA), a caffeic acid ester belonging to the hydroxycinnamic acid group, derives its name from rosemary (*Salvia rosmarinus linn.*) and is a natural phenolic compound found in various plant species, including rosemary, sage, mint, and basil. RA exhibits anticancer properties such as apoptotic induction, inhibition of cell proliferation, metastasis, and angiogenesis. However, the rapid metabolism and low bioavailability of RA limit its therapeutic efficacy. In this context, rosmarinic acid-loaded PLGA nanoparticles (RANPs) have been developed using the biodegradable polymer PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)) to enhance RA's bioavailability and optimize its therapeutic activity.

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and highly aggressive brain tumor in adults, accounting for 15% of primary brain tumors and 55% of gliomas. The average survival period ranges from 12 to 15 months. The blood-brain barrier

(BBB) limits drug penetration, making GBM treatment particularly challenging. Therefore, novel approaches capable of crossing the BBB are urgently needed.

In this study, the effects of RANPs synthesized using the single emulsion (w/o) solvent evaporation method on cell viability, cell migration, and apoptosis were investigated in the U87MG human glioblastoma cell line. The synthesized RANPs exhibited an average size of 93.42 ± 4.11 nm, a PDI value of 0.115 ± 0.017 , a zeta potential of -42.1 ± 5.4 mV, a reaction yield of 69%, an encapsulation efficiency of 37.5%, and a loading efficiency of 0.05%. Cytotoxic activity assessed using the MTT method revealed that the IC₅₀ of RA at 48 hours was 9 µg/ml, while the IC₅₀ of RANPs was calculated as 4.5 µg/ml. In the wound healing assay, the wound closure rate, which was 100% in the control group, decreased to 30% and 35% in the RA and RANP groups, respectively, indicating suppressed cell migration. Gene expression analysis demonstrated that RANP treatment caused an 18.52-fold increase in Bax gene expression, a 13.9-fold increase in Bcl-2 expression, and a 6.025-fold increase in cytochrome c expression. In contrast, RA treatment resulted in a 1.64-fold, 6.04-fold, and 2.12-fold increase in the expression of these genes, respectively. The high Bax/Bcl-2 ratio observed with RANP treatment indicates enhanced mitochondrial permeability and the activation of apoptotic signaling pathways.

In conclusion, the RANP formulation improved the therapeutic efficacy of RA and demonstrated strong cytotoxic and apoptotic effects in the U87MG glioblastoma cell line.

Keywords: Rosmarinic acid, glioma cancer, glioblastoma, PLGA, apoptosis

1.1 Literatür Özeti

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyüme ve bölünme ile karakterize olduğu kötü huylu tümörlere verilen ortak addır. Tümörler, hücrelerin kontrolsüz ve sınırsız çoğalmaları ile oluşan kitlelere denir [1]. Glial tümör, merkezi sinir sistemi tümörlerine verilen genel bir terimdir. Beynin glial kısmından (Yunancada "yapıştırıcı" anlamına gelir) veya destek dokusundan kaynaklanan herhangi bir tümöre "glioma" adı verilir. Glial tümörler (Gliomalar) Astrositomlar, ependimal tümörler, oligodendroglioma ve primitif nöroektodermal tümörler olmak üzere dört grupta incelenir. Astrositomun en kötü huylu formu primer beyin tümörlerinden olan Glioblastoma multiforme (GBM)dur [2]. Glioblastoma multiforme (GBM), primer beyin tümörleri arasında en yaygın görülen ve kötü huylu yapısıyla dikkat çeken bir kanser türüdür. "Gliomaların yaklaşık %50'si glioblastomadır (GBM). GBM, yeni adıyla 'glioblastom grade IV' ("multiforme" artık WHO tanımının bir parçası değildir, ancak glioblastoma hala sıklıkla "GBM" olarak kısaltılmaktadır) en yüksek dereceli (Grade IV) glioma tümördür [3]. Astrositomlar, büyüdükleri yıldız şeklindeki hücreler olan astrositlerden adını alır. Glioblastomayı diğer tüm derecelerden ayıran histolojik özellikler; nekrozun (ölü hücreler) varlığı ve tümör çevresindeki kan damarlarının artmasıdır [4]. Glioblastoma multiform, primer beyin tümörlerinin %15'ini ve tüm gliomaların %55'ini oluşturan ve en sık görülen yetişkin gliomudur [2]. GBM En sık 45-65 yaş arası yetişkinlerde görülür ve kadınlardan çok erkekleri etkiler. Tedavi edilmesi zor bir tümör olan GBM de 12-15 ay arasında değişen ortalama sağkalım görülmektedir [5]. Cerrahi, glioblastoma tedavisinin ilk aşamasıdır. GBM'li çoğu insan cerrahi rezeksiyondan sonra ya orijinal bölgenin yakınında ya da beynin daha uzak yerlerinde tekrarlayan tümörler

geliştirir. Tipik olarak, hızla çoğalan GBM hücrelerinin DNA'sına zarar vererek tekrarlayan hastalığı bastırmak ve yavaşlatmak amacıyla ameliyattan sonra radyasyon ve kemoterapi gibi yöntemler kullanılır. En agresif ve en sık görülen primer malign beyin tümörü olan GBM'nin tedavisindeki zorluk, beyni periferel dolaşımdan ayıran MSS'deki doğal savunma mekanizması; kan beyin bariyeri (KBB)'den kaynaklanmaktadır [6]. Kan-Beyin bariyeri kan ile beyin arasında bulunan önemli bir hücresel bariyerdir [7]. Bu fizyolojik engel, ilaç penetrasyonunu kısıtlar, dolayısıyla bariyeri geçen ilacın beyin hücrelerine etkin dozda ulaşması yavaşlar veya engellenir [8]. PLGA NP'lerin KBB'den geçebildiği çalışmalarda gösterilmiştir [9]. Bu nedenle KBB'yi geçmeyi amaçlayan ajanların sağlanmasına yönelik potansiyel stratejilere ve tedavide kullanılan ilaçların, aktivitesini ve biyoyararlanımını arttıracak ve yan etkilere azaltacak, yeni ilaç keşiflerine ve yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bitkileri zararlı etkenlere karşı koruyan fenolik bileşikler, temel olarak fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki ana gruba ayrılır [10], [11]. Flavonoidler; flavanoller, flavanonlar, flavonoller, flavonlar, izoflavonlar ve antosiyaninler olmak üzere altı alt gruba ayrılmaktadırlar [12]. Fenolik asitler ise kendi içinde hidroksisinamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. Hidroksisinamik asitler arasında yer alan Rosmarinik asit (RA), 3,4-dihidroksifenilasetik asit, doğal olarak oluşan bir kafeik asit esteridir [13]. Adını biberiyeden (*Salvia rosmarinus* linn.) alan rosmarinik asit, biberiye, adaçayı, nane ve fesleğen dahil olmak üzere birçok bitki türünde bulunan yaygın bir fenolik bileşiktir. Birçok çalışma, kanser, diyabet, inflamatuvar bozukluklar, nörodejeneratif bozukluklar ve karaciğer hastalıkları dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda RA'nın çoklu terapötik faydalarını doğrulamıştır. Birçok çalışmada, RA'nın anti-plazmodik, anti-viral ve anti-bakteriyel bir ilaç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, antiviral, antiinflamatuvar, antiproliferatif ve yüksek antioksidan kapasitesi nedeniyle bu doğal polifenol, kanser tedavisi araştırmalarında dikkat çekmektedir [14], [15]. Rosmarinik asit, apoptozun indüklenmesi ve hücre proliferasyonu, metastaz ve anjiyogenezin inhibisyonu gibi antikanser özelliklere sahip potansiyel bir kemoterapötik ajandır [16]. Çalışmalar RA'nın antikanser aktivitesinin, inflamatuvar yanıtlar, antioksidan denge, tümör başlatılması ve ilerlemesi gibi çeşitli kanserler üzerinde etkili olabileceğini

göstermiştir. RA, melanom ve lösemi hücrelerinin yanı sıra kolon, meme, karaciğer, mide gibi çeşitli organlardaki tümörlerin gelişimini baskılayabilir [17]. Kanserde hücre sinyalleşmesinin karmaşıklığı, kanserle mücadele edebilecek sinyal moleküllerinin işlevini hedefleyebilen ve modüle edebilen terapötik ajanların araştırılmasının başlatılmasına neden oldu. Bu amaçla, özellikle doğal ürünlerin antikanser potansiyelinden yararlanılarak tedavi stratejisi geliştirmek umut verici bir terapötik yaklaşım gibi görünmektedir. İlginç bir şekilde, çeşitli epidemiyolojik çalışmalar meyve/sebze açısından zengin bir diyet ile kanser insidansı veya ilerlemesi arasındaki ters ilişkiyi vurgulamaktadır [17]. Kolon kanseri HT-29 hücrelerinde, 5, 10 ve 20 mikromol/L dozlarındaki rosmarinik asitin (RA), 12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA) kaynaklı (siklooksijenaz-2) COX-2, promotörünün aktivitesini ve protein seviyelerini azalttığı bildirildi [18]. Cilt kanseri ve melanomda vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) mRNA ekspresyonlarındaki artış, RA'nın topikal uygulamasıyla tersine çevrilmiştir; bu, RA'nın, antiinflamatuvar ve aynı zamanda antioksidan etki uygulayarak cilt tümörlerine karşı etki ettiğini göstermektedir [19]. Oral olarak uygulanan RA'nın antitümör etkisi, İsviçre albino farelerinde 7,12dimetilbenz (a)antrasen (DMBA) kaynaklı cilt karsinogeninde değerlendirilmiş ve DMBA'nın 15 hafta boyunca topikal olarak tek başına uygulanmasıyla %100 tümör oluşumu gözlenmiştir. RA uygulaması tümör oluşumunu azalttığı, antioksidan durumu olumlu şekilde modüle ettiği ve apoptotik belirteçlerdeki (p53, Bcl-2, kaspaz-3 ve kaspaz-9) DMBA'nın neden olduğu değişiklikleri normalleştirdiği kanıtlanmıştır [20]. Akciğer karsinomu A549 hücrelerinde, RA %50 inhibisyon gösterdiği ve bu hücrelerde COX-2 aktivitesini inhibe ettiği kanıtlanmıştır [21]. İnsan hepatoma HepG2 hücrelerinde RA, apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonunu arttırdı ve apoptozu indükledi, böylece hepatoselüler karsinoma karşı umut verici bir aday olduğu gösterilmiştir [22]. İnsan meme kanseri MCF7 hücre hattında, RA'nın DNA metiltransferaz aktivitesini inhibe ettiği bildirildi [23]. Kanserde, DNA metilasyon modeli anormal değişikliklere uğrar ve bu da çok çeşitli tümör baskılayıcı genlerin promoter hipermetilasyonuna maruz kalmasına ve transkripsiyonel olarak sessiz hale gelmesine neden olarak tümör oluşumuna yol açar. Bu nedenle, DNA metiltransferazın inhibisyonu bu etkiyi tersine çevirebilir ve kansere karşı

potansiyel terapötik değere sahip olabilir. İnsan glioma hücreleri üzerinde RA ve quercetin'in Hsp-siRNA transfeksiyonu ile kombine tedavisi, Hsp27 ekspresyonunu baskıladı ve kaspaz-3 aktivitesini arttırdı, bu da RA'nın glioblastoma tedavisi için güçlü bir kombinatoriyal ajan olduğunu gösterdi [24], [25]. Kanser tedavisinde en önemli sorunlardan biri kemoterapide kullanılan ilaçların; düşük stabilite, düşük suda çözünürlük, spesifik olmayan toksisite, ciddi yan etkiler, düşük doza bağlı gelişen ilaç dirençliliği ve ilacın etki göstereceği hedef doku dışında tüm vücutta etkisini göstermesidir. Rosmarinik asitin'in, hızlı metabolizmasını önlemek, insan vücudunun diğer bölümlerine nüfuz etmesini sağlamak ve biyoyararlanımını arttırmak için tasarlanan farmasötik formülasyonlar da gelecekteki araştırmalar için kritik bir konudur [26]. Böbrek yoluyla hızla atılır ve sistemik absorpsiyon derecesi de düşüktür, bu da RA'nın yüksek etkinlik ve potansiyele sahip olmasına rağmen tıbbi kullanımını sınırlar [27]. Nanopartiküllerin, ilacın çözünürlüğünü arttırması, sadece kanserli bölgeye etki edebilmesi, kanda etkin bir şekilde uzun süre kalması, aynı anda hem etken maddeyi hem görüntüleyici maddeyi bulundurabilmesi, belirli bir hızda ve yeterli miktar da salınması gibi önemli avantajları vardır. Kansere karşı uygulamalarda, nanopartiküllerin kullanılması umut vadeden bir durumdur [28]. Nanopartiküller içinde paketli olarak kana verilen kanser ilacı serbest olmadığı için kandaki sağlıklı hücrelerle etkileşme ve onlara zarar verme potansiyeli daha düşüktür. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), biyobozunur ve biyoyumlu özellikleri sayesinde ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılan güvenilir bir polimerdir. PLGA nanopartiküller, terapötik ajanların yüzeyde adsorbe edilmesi, iç kısımda hapsedilmesi veya partikül içinde çözündürülmesi yoluyla etkin madde taşıyabilirler. Bu sistemler, ilacın toksisitesini azaltırken biyoyararlanımını ve etki süresini artırarak kontrollü salım sağlarlar. Ayrıca, PLGA'nın yüksek kararlılığı ve ilaç yükleme kapasitesi, onu diğer nanotaşıyıcılardan üstün kılar [29]. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanmış bir polimer olması da klinik uygulamalarda kullanımını desteklemektedir [30], [31].

Bu çalışma kapsamında, rosmarinik asidin biyolojik etkinliğini ve anti-kanser aktivitesini artırmak amacıyla, rosmarinik asit yüklü PLGA nanopartikül sistemleri geliştirilmiştir. Üretilen nanopartiküllerin karakterizasyonu yapılmış ve U87MG insan glioblastoma hücre hattı üzerinde hücre canlılığına, hücre göçüne ve apoptotoza olan etkileri incelenmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı, fenolik bir bileşik olan rosmarinik asit ile yüklü PLGA nanopartikül sistemlerinin (RANP) geliştirilmesi ve bu sistemlerin U87MG insan glioblastoma kanser hücre hattında anti-kanser etkilerinin hücresel ve moleküler düzeyde araştırılmasıdır. Bu amaca ulaşmak için, RANP' nin sitotoksik ve apoptotik aktivitelerinin serbest Rosmarinik asit ile karşılaştırmalı olarak U87MG insan glioblastoma kanser hücre hattında incelenmesi hedeflenmektedir.

Bu çalışmada, rosmarinik asitin serbest formu ile nanopartikül sistemine entegre edilmiş formunun, U87MG insan glioblastoma hücre hattında sitotoksik etkinlik, hücre migrasyonu ve apoptoz indüksiyonu üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

1.3 Hipotez

Biyobozunur ve hızlı metabolize olduğu bilinen rosmarinik asitin, PLGA nanopartiküler sistemine enkapsüle edilerek glioblastoma hücre hattına uygulanması, molekülün enzimatik yıkım ve biyokimyasal değişimlerden korunarak daha etkili anti-kanser aktivite sağlanması ve kontrollü salınım kinetiği ile ilacın sağlıklı hücrelere olan sitotoksik etkinin azaltılması açısından büyük önem göstermektedir.

Bitkilerden elde edilen ve anti-kanser aktivitesi bulunan sekonder metabolitlerin biyoyararlanımının artırılmasına olanak sağlayacak benzer çalışmaların gelecekte klasik kanser tedavi yöntemlerine destekleyici tedavi olarak uygulanacağı öngörülmektedir. Bu çalışma ile RA yüklü PLGA nanopartiküllerin glioblastoma tedavisinde umut vadeden bir strateji sunduğunu göstermekle birlikte, gelecekteki çalışmalar için yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.

2.1 Kanser

“Tıbbın Babası” olarak kabul edilen Yunan hekim Hipokrat, iyi huylu ve kötü huylu tümörler arasındaki farkı tanıyan ilk kişi olarak kabul edilir. (MÖ 460-370), ülser oluşturmeyan tümörleri tanımlamak için ‘karsinoz ve karsinom’ terimlerini ve yengeçlerin damarlarını şişmiş bazı tümörlere benzettiği için Yunanca ‘yengeç’ anlamına gelen terimi kullanmıştır. Romalı hekim Celsus (MÖ 28-50), yunanca kanser anlamına gelen terimi (cancer) Latince yengeç (crab) terimi ile değiştirmiştir. Onkoloji veya kanser araştırmalarının kökeni ise ‘Oncos (Yunanca şişlik) kelimesine dayanmaktadır. MS 130-200 yılları arasında yaşamış olan Yunan hekim Galen, tümörleri tanımlamak için "oncos" terimini kullanmıştır [32].

"Kanser", hücrelerin kontrolsüz büyüme ve bölünme ile karakterize olduğu kötü huylu tümörlere verilen ortak addır. Tümörler, hücrelerin kontrolsüz ve sınırsız çoğalmaları ile oluşan kitlelere denir. Karsinom, tıp dilinde epitel ya da bez dokularında oluşan kanser türlerini tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Tümörler, patolojik özelliklerine göre iki gruba ayrılır: iyi huylu (selim) tümörler ve kötü huylu (habis) tümörler. İyi huylu tümörler genellikle zararsızdır, ancak kötü huylu tümörler kansere neden olabilir [33]. Kanser oluşumuna neden olan etkilere kanserojen ya da karsinojen denir. Neredeyse tüm kanserler klonal kökenlidir, yani bir grup hücreden ziyade tek bir progenitör hücreden köken alırlar. Belirli bir hücre tipinde veya dokusunda kanser gelişiminde genetik ve epigenetik değişiklikler birikir. Temel hücresel fonksiyonlar üzerindeki genetik kontrolü bozan, her biri DNA replikasyon hatalarından, onarılmamış endojen veya eksojen DNA hasarından, kalıtsal mutasyonların sonucu olabilen bir dizi spesifik mutasyondan

kaynaklanır. Kanser, heterojen bir hastalık grubunu ifade eder. Proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler dahil olmak üzere normal hücresel fonksiyonlar ve büyüme özellikleri için önemli olan genlerin ifadesindeki değişiklikler, kayıplar, amplifikasyonla sonuçlanan normal DNA dizisindeki değişikliklerin zamanla birikmesinin neden olduğu bir hastalıktır [34].

Karsinogenez sürecinde proto-onkogenler, gen ekspresyonunun artmasıyla birlikte onkogenlere dönüşebilen normal genlerdir. Bu genler, hücre büyümesini ve proliferasyonunu kontrol eden büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri ve transkripsiyon faktörlerini kodlamakta önemli bir rol oynar.

Proto-onkogenlerin onkogene dönüşmesi için alellerden yalnızca birinde mutasyon oluşması yeterlidir, bu nedenle bu mutasyonlar hücresel düzeyde baskındır [34], [35]. Onkogenler, kontrolsüz protein üretimi ile hücre döngüsünü düzenleyemez hale gelir ve bu durum, kanser gelişiminin erken aşamalarında kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açar. Onkogen mutasyonları, normal hücre döngüsü düzenlemesini engelleyerek kontrolsüz hücre replikasyona neden olabilir. Bir proto-onkogen örneği; Ras geni, hücresel sinyal iletiminden sorumlu zarla ilişkili bir G proteinini kodlar. Mutasyona uğramış Ras ürünleri, uygun büyüme faktörü reseptör sinyalinin yokluğunda bile aktif kalır. Ras'daki mutasyonlar tüm kanserlerin %30'unda bulunur. Karsinogenez sırasında işlevi kaybolan tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonu tamamen kaybolmadan (normal protein ürününün yokluğu) önce her iki allel kopyası da inaktive edilir, yani çekinik olarak sınıflandırılabilir. Resesif özellik gösteren tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonel mutasyonları, büyümeyi engelleyen mekanizmaların kaybına neden olur. Mutasyonlar kalıtsal (germline mutasyonları) veya edinilmiş olabilir.

Bir tümör baskılayıcı gen örneği p53 geni: hücre döngüsü kontrolünde ve genomik bütünlüğün korunmasında rol oynayan bir transkripsiyonel düzenleyicidir. İnsan kanserlerinin %50'sinde p53 geninde mutasyonlar tespit edilmektedir [36].

Kanser hücrelerini karakterize etmeye yönelik çeşitli çalışmalar içinde en önemli karakterizasyonu, Hanahan ve Weinberg gerçekleştirmiştir [37]. Bu özellikler, kanser hücrelerinin normal hücrelerden farklı olarak sürekli bölünme yeteneği, büyüme faktörlerine bağımlı olmadan kendi kendine yeterlilik gösterme,

programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) kaçış, büyüme baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, sürekli anjiyogenez (yeni kan damarlarının oluşumu) indüklemeye ve doku invazyonu ile metastaz yapma gibi özellikleri içermektedir. Bu özellikler, kanser hücrelerinin sınırsız bir replikasyon potansiyeline sahip olmalarını, tümörlerin gelişmesini ve yayılmasını destekleyen temel mekanizmaları açıklar. Ayrıca, kanserin tedavisi açısından bu özelliklerin hedeflenmesi, daha etkili terapötik stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır[38].



Şekil 2. 1 Kanser hücrelerinin temel altı ayırt edici özelliği [38].

2000: Kanser Biyolojisinin Temelleri

1. Sürekli proliferatif sinyal verme: Hücrelerin sürekli büyüme sinyalleri olarak kontrolsüz şekilde çoğalması.
2. Büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçış: Hücre büyümesini durduran mekanizmaların etkisiz hale getirilmesi.
3. Hücre ölümüne direnç: Programlanmış hücre ölümüne (apoptoz) karşı direnç geliştirilmesi.
4. Sınırsız çoğalma potansiyeli: Hücrelerin sonsuz sayıda bölünebilme kapasitesine sahip olması.
5. Anjiyogenez oluşturma: Tümörlerin büyümesini desteklemek için yeni kan damarlarının oluşturulması.

6. İnvazyon ve metastazı aktive etme: Kanseri hücrelerinin çevredeki dokulara yayılması ve uzak organlara metastaz yapması [38].

2011: Ortaya Çıkan Özellikler

7. Hücresel enerji metabolizmasının yeniden programlanması: Enerji üretim yollarını değiştirerek hayatta kalma avantajı elde ederler.
8. Bağışıklık sisteminden kaçış: Bağışıklık hücrelerinin saldırılarından korunma yeteneği geliştirirler.
9. Genomik kararsızlık ve mutasyonlar: DNA hasarları ve mutasyonlarla genetik çeşitlilik kazanırlar.
10. Tümör mikroçevresini destekleyen inflamasyon etkisi: Tümörün çevresi inflamasyon olması [39].

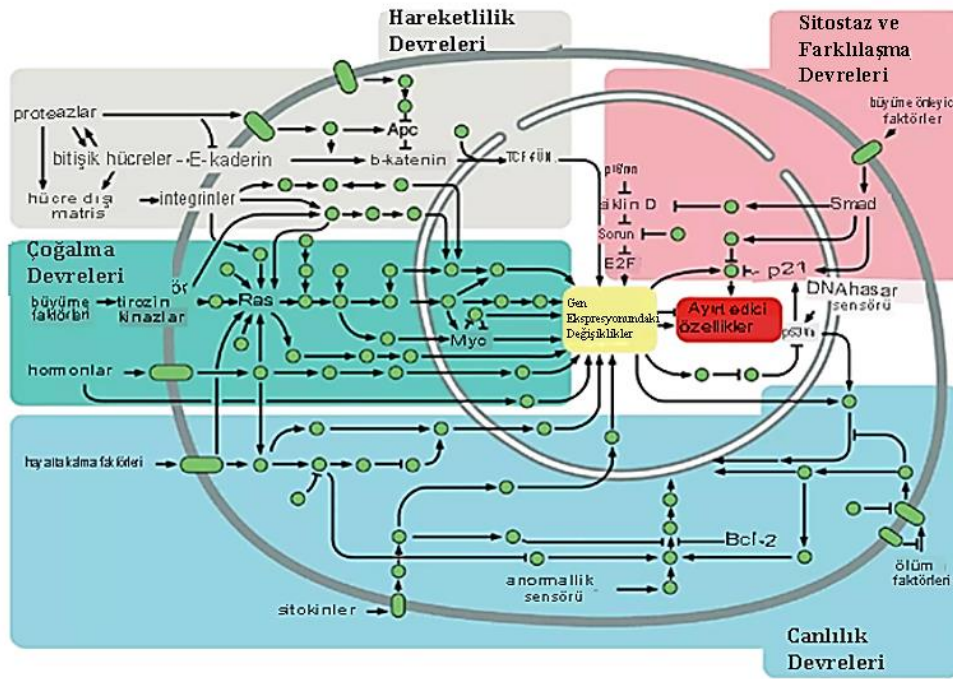
2020: Gelişmiş Kavrayışlar

11. Mikroçevresel değişimleri sürdürme: Tümör mikroçevresinde kanser gelişimini destekleyen değişimlerin korunması (bağışıklık hücreleri, fibroblastlar ve damarsal yapılar gibi bileşenler).
12. Epigenetik değişiklikler: Gen ekspresyonunu düzenleyen, ancak DNA dizisinde değişikliğe yol açmayan epigenetik modifikasyonlar (DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve gen ekspresyonunu düzenleyen diğer epigenetik mekanizmalar).

2022: Modern Sınırlar

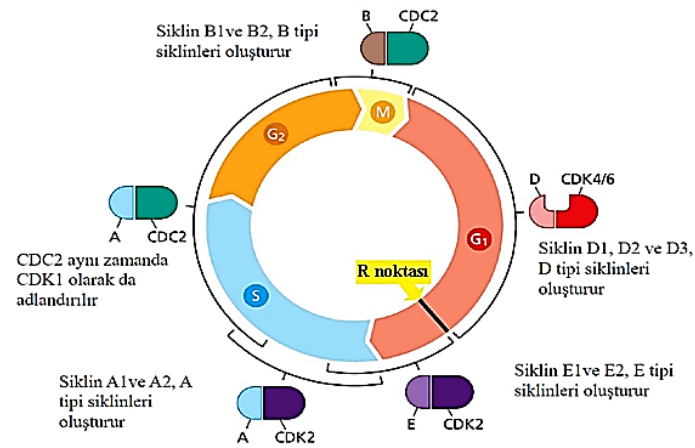
13. Hücresel senesansın baskılanması: Tümör hücreleri, yaşlanma ve büyümeyi durduran hücresel senesans süreçlerinden kaçarak büyümeye devam edebilir.
14. Tümör-promotör inflamasyon: Kanseri oluşumunu ve ilerlemesini destekleyen kronik inflamasyon.
15. Değiştirilmiş mikrobiyom: Mikrobiyomdaki değişikliklerin kanser gelişimine ve tümör mikroçevresine etkisi.
16. Nörolojik faktörlerin etkisi: Sinir sistemi ile tümör arasındaki ilişkilerin kanserin seyrine etkisi [39].

Kanser, hücresel sinyal iletim yollarının kontrolsüz aktivasyonu ya da baskılanması sonucu ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır. Kanser gelişiminde dört ana hücresel yol öne çıkar: Hareketlilik, Çoğalma, Hayatta Kalma ve Sitostaz/Farklılaşma Devreleri. Bu yollar, hücrenin büyüme, hareket, farklılaşma ve ölüm süreçlerini düzenler. Şekil 2.2 'de görüldüğü üzere, bu yolların gen ekspresyonu ve sinyal iletimi üzerindeki etkileri birbiriyle iç içe geçmiş bir şekilde çalışır [35].



Şekil 2. 2 Hücre içi sinyal iletim yolları; burada farklı renkli alanlarda gösterilen ayrı alt devreler, kanserin gelişiminde dört ana hücresel yol ve sinyal iletim ağı kritik rol oynar, hareketlilik devresi (motility circuits), çoğalma devresi (proliferation circuits), hayatta kalma devresi (viability circuits) ve sitostaz ve farklılaşma devresi (cytostasis and differentiation circuits)[35].

Ancak bu süreçlerde meydana gelen anormallikler, hücrelerin kontrolsüz şekilde bölünmesine, çevre dokulara yayılmasına ve apoptozdan kaçınmasına yol açar [40]. Hareketlilik devresi, hücrelerin komşu dokulara invazyon ve metastaz yeteneği kazanmasını sağlar. Normal hücrelerde hücreler arası bağlantıyı sağlayan E-kaderin ve β -katenin, hücre yapışkanlığını ve doku bütünlüğünü korur. Ancak E-kaderin kaybı ya da β -katenin mutasyonu, hücrelerin invaziv özellikler kazanmasına neden olur. Hücre dışı matrisi parçalayarak hücrelerin çevresel dokulara yayılmasını sağlayan matriks metalloproteinazlar ve hücre hareketliliğini kolaylaştıran integrinler ile aktin sitoskeletonunun yeniden düzenlenmesini kontrol eden Rho GTPazlar, metastazın önemli düzenleyicileridir. Bu mekanizmalar epitel-mezenkimal geçiş (EMT) ile birleştiğinde kanser hücreleri daha invazif hale gelir ve metastatik süreç başlar. Çoğalma devreleri, hücrelerin büyüme ve bölünmesini kontrol eden sinyal yollarını içerir [41]. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gibi tirozin kinaz reseptörlerinin aktivasyonu ve RAS-RAF-MEK-ERK yolunun mutasyonla sürekli aktif hale gelmesi, hücre bölünmesini kontrolsüz bir şekilde artırır. Aynı zamanda PI3K-AKT-mTOR yolunun aktivasyonu, hücre büyümesi ve protein sentezini teşvik eder. Tümör baskılayıcı gen PTEN'in kaybı ise bu süreçleri hızlandırır. Myc onkogeninin aşırı ekspresyonu ve siklin-CDK komplekslerinin, özellikle G1-S geçişini kontrol eden Siklin D/CDK4 ve Siklin E/CDK2 komplekslerinin, hiperaktivasyonu, hücre döngüsünün kontrolsüz bir şekilde ilerlemesine neden olur [42]. Bu değişiklikler, kanser hücrelerine sınırsız çoğalma potansiyeli kazandırır.



Şekil 2. 3 Hücre döngüsünün aşamaları ve siklin-CDK ilişkisi [43], [44].

Hücrelerin bölünme ve çoğalma süreçleri ise hücre döngüsü aracılığıyla sıkı bir şekilde kontrol edilir (Şekil 2.3). Bu süreçte siklinler ve CDK'lar, hücre döngüsünün her bir fazına özgü kontrol noktalarını düzenler. Örneğin, Siklin D ve CDK4/6 G1 fazında hücre döngüsünün ilerlemesini başlatırken, Siklin E ve CDK2 hücrenin S fazına geçişini sağlar. Kanseri hücrelerinde bu düzenleyici mekanizmalar genellikle bozulur; siklinlerin aşırı üretimi, CDK inhibitörlerinin kaybı ya da Rb ve P53 gibi tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, hücre döngüsünün düzgün bir şekilde kontrol edilememesine yol açar [45]. Bu bozukluklar, hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmamasını, apoptozdan kaçmasını ve metastaz potansiyelini artırmasını sağlar. Hücrelerel sinyal yolları ve hücre döngüsü arasındaki bu karmaşık etkileşimlerin detaylı bir şekilde anlaşılması, kanserin moleküler mekanizmalarını hedefleyen terapötik stratejiler geliştirilmesi için kritik öneme sahiptir [46].

Hayatta kalma devreleri ise hücrelerin apoptozdan kaçarak hayatta kalmasını sağlar. Bcl-2 ailesi üyeleri, mitokondri yoluyla apoptozu düzenlerken, Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu apoptozu baskılar ve hücrelerin yok edilmesini önler. P53 tümör baskılayıcı geninin mutasyonları ise DNA hasarına rağmen apoptozu engelleyerek kanser hücrelerinin hayatta kalmasını destekler. AKT ve NF- κ B yollarının aktivasyonu da apoptozu baskılayarak hücrelerin radyoterapi ve kemoterapiye direnç geliştirmesine katkıda bulunur [47].

Sitostaz ve farklılaşma devreleri, hücre bölünmesini durdurarak hücrelerin farklılaşmasını sağlar. Sitostaz, hücrelerin büyüme ve çoğalma hızlarının durdurulması veya yavaşlatılması anlamına gelir. Ancak kanser hücrelerinde bu mekanizmalar genellikle bozulur. TGF- β sinyal yolu, normalde büyümeyi durduran bir sinyal olmasına rağmen, kanser hücrelerinde proliferasyonu artıracak şekilde yeniden programlanabilir. P16 ve P21 gibi CDK inhibitörlerinin kaybı veya Rb proteininin işlev kaybı, hücre döngüsünün duraklama noktalarının atlanmasına yol açar. Bu değişiklikler, hücrelerin daha ilkel, farklılaşmamış ve agresif bir fenotip kazanmasına neden olur.

Sonuç olarak, bu sinyal yollarının mutasyonlar veya epigenetik değişikliklerle kontrolsüz aktivasyonu, kanser hücrelerine sınırsız çoğalma, apoptozdan kaçış, anjiyogenez ve metastaz yetenekleri gibi temel özellikler kazandırır. Modern kanser

tedavileri, bu yolları hedefleyen moleküllerin geliştirilmesi ile kanser hücrelerinin kontrol altına alınmasını amaçlar [48].

2.2 Glioblastoma

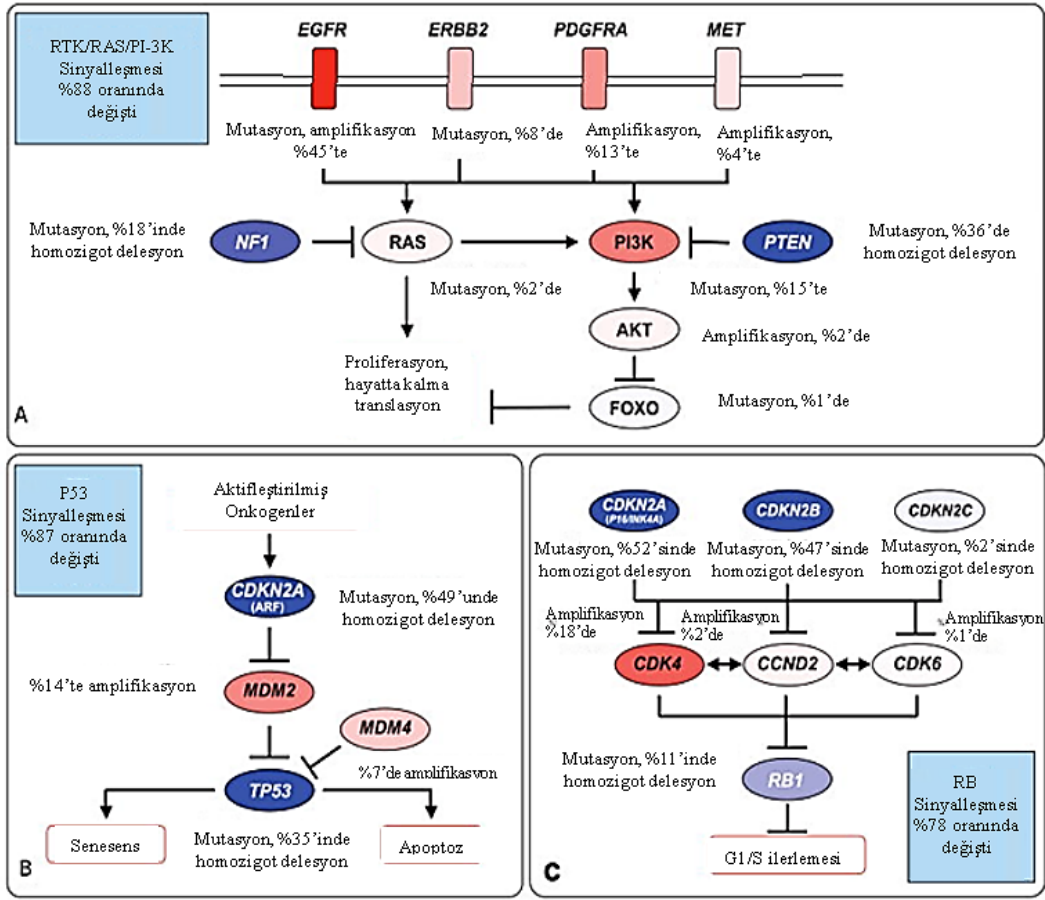
Glioblastoma multiform, tüm gliomaların %55'ini ve primer beyin tümörlerinin %15'ini oluşturan en sık görülen yetişkin gliomudur. GBM En sık 45-65 yaş arası yetişkinlerde görülür ve kadınlardan çok erkekleri etkiler. Lokalizasyona ve artan kafa içi basıncına bağlı olarak, hastalığın klinik evresinin bir sonucu olarak, GBM'nin en sık görülen belirtileri arasında baş ağrıları, ataksi, baş dönmesi, görme bozuklukları (bulanık görme, diplopi) ve sık görülen senkop yer alır. Bu spesifik olmayan semptomlar nedeniyle, glioma sıklıkla enfeksiyonlar, inflamatuvar süreçler ve dolaşım ve immünolojik hastalıklar olarak yanlış teşhis edilir. Tedavi edilmesi zor bir tümör olan GBM de 12-15 ay arasında değişen ortalama sağkalım görülmektedir. Gliomalar (Glial tümör), merkezi sinir sistemi tümörlerine verilen genel bir isimdir [49]. Beynin glial kısmından (Yunancada "yapıştırıcı" anlamına gelir) veya destek dokusundan kaynaklanan herhangi bir tümöre "glioma" adı verilir. Glial tümörler (Gliomalar) Astrositomlar, ependimal tümörler, oligodendroglioma ve primitif nöroektodermal tümörler olmak üzere dört grupta incelenir. Astrositomlar arasında en kötü huylu olan form, primer beyin tümörleri sınıfına giren glioblastoma multiforme (GBM) olarak bilinir. Bu tümör, hızlı büyüme özelliği ve agresif seyri nedeniyle diğer astrositom türlerinden daha ciddi bir klinik tabloya sahiptir [50]. Glioblastoma multiforme (GBM), en agresif ve en yaygın beyin kanser türlerindendir. Gliomaların yaklaşık %50'si glioblastomadır (GBM). GBM, yeni adıyla 'glioblastom grade IV' ("multiforme" artık WHO tanımının bir parçası değildir, ancak glioblastoma hala sıklıkla "GBM" olarak kısaltılmaktadır) en yüksek dereceli (Grade IV) glioma tümördür. Astrositomlar, büyüdükleri yıldız şeklindeki hücreler olan astrositlerden adını alır.

Glioblastomayı diğer tüm derecelerden ayıran histolojik özelliği nekrozun varlığı (ölü hücreler) ve tümör çevresinde kan damarlarının artmasıdır.

GBM tümör gelişiminde etkin rol oynayan sinyal yolları şu şekildedir (Şekil 2.4);

(i) reseptör tirozin kinaz (RTK) genlerinin amplifikasyonu ve mutasyonel aktivasyonu yoluyla büyüme faktörü sinyalleme sisteminin düzensizliği; (ii) fosfatidil

inositol 3-kinaz (PI3K) yolunun aktivasyonu ve (iii) p53 ve retinoblastoma (Rb) tümör baskılayıcı yolların etkisizleştirilmesi [51] [52].



Şekil 2. 4 Üç kritik sinyal yolunda sık görülen genetik değişiklikler

(a) RTK/RAS/PI-3K'ün (b) p53'ün ve (c) RB'nın sinyal yollarının bileşenleri için birincil dizi değişiklikleri ve önemli kopya numarası değişiklikleri gösterilmiştir. Kırmızı, aktifleşen genetik değişiklikleri gösterir; sıklıkla değişen genler, kırmızının daha koyu tonlarını gösterir. Tersine, mavi, etkisizleştirici değişiklikleri gösterir; daha koyu tonlar, daha yüksek bir değişiklik yüzdesine karşılık gelir. Belirli bir yolun değiştirilmiş her bileşeni için, değişikliğin doğası ve etkilenen tümörlerin yüzdesi belirtilir. Mavi kutular, belirlenen yolun bilinen en az bir bileşen genindeki değişikliklere sahip glioblastomaların nihai yüzdelerini içerir [52].

Manyetik rezonans görüntüleme (MRG), glioblastoma multiforme (GBM) gibi beyin tümörlerinin tanısında en yaygın ve en etkili yöntem olarak kullanılır. Bu görüntüleme tekniği, beyin dokusundaki anormallikleri yüksek çözünürlükle göstererek tümörün boyutunu ve yerini belirlemeye yardımcı olur, böylece doğru bir tanı konmasına olanak sağlar [53]. Kesin tanı, çıkarılan tümörün veya parçalarının geleneksel histolojik, sitolojik ve histokimyasal yöntemler kullanılarak histopatolojik olarak incelenmesine dayanır. Beyin cerrahisi ile tümörün tamamen çıkarılamadığı durumlarda, ince iğne aspirasyon biyopsisi yapılır. Bu işlemde, tümörden küçük bir doku örneği alınarak incelenir. Morfolojik tanı WHO tarafından tanımlanan kriterlere dayanmaktadır. Tümörlerin merkezi sinir sistemindeki evrelemesi, morfolojilerinin, malignite derecesinin (derece I-IV), proliferatif indeksin, tedaviye yanıtın ve hayatta kalma süresinin değerlendirilmesini içerir. Derece I kötü huylu olmayan tümörleri içerir, derece II nispeten kötü huylu olmayan tümörler için kullanılır, derece III düşük dereceli kötü huylu tümörleri içerirken, derece IV en kötü huylu tümörleri belirtir ve ortalama sağkalım 6-12 aydır. Glioblastoma multiforme, derece IV olarak sınıflandırılan bir kanserdir [54].

2.2.1 Glioblastoma Tedavisi

Cerrahi, glioblastoma tedavisinin ilk aşamasıdır. GBM'li çoğu cerrahi rezeksiyondan sonra ya orijinal bölgenin yakınında ya da beynin daha uzak yerlerinde tekrarlayan tümörler geliştirir. Glioblastoma (GBM) tedavisini zorlaştıran birkaç faktör vardır. İlk olarak, tümör hücreleri hızlı bir şekilde bölünmelerine rağmen, geleneksel tedavilere karşı oldukça dirençlidir. Ayrıca, beynin kendini onarma kapasitesinin sınırlı olması, tedavi sırasında oluşabilecek hasarın kalıcı ve ciddi sonuçlar doğurmasına neden olabilir [55]. Tipik olarak, hızla çoğalan GBM hücrelerinin DNA'sına zarar vererek tekrarlayan hastalığı bastırmak ve yavaşlatmak amacıyla cerrahiye takiben genellikle temozolomid ile radyoterapi ve kemoterapi kullanılır [54].

2.2.1.1 Cerrahi Tedavisi

Glioblastoma multiform (GBM) tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi temel yaklaşımlardır. Cerrahi tedavi, tümörün tamamen çıkarılamaz yapısından

dolayı genellikle eksik bir küçültme sağlasa da intrakraniyal basıncı azaltmak, nöbetleri kontrol altına almak ve patolojik tanıyı doğrulamak gibi önemli avantajlar sunar. Bununla birlikte, radikal cerrahi bazı riskler taşır; bunlar arasında tümör hücrelerinin cerrahi müdahale ile yayılımı, cerrahi komplikasyonlar ve nörolojik hasar riski bulunur. Modern cerrahi yöntemler, intraoperatif MRI, 5-ALA ve robotik sistemler gibi teknolojilerle desteklenerek daha güvenli ve etkili hale gelmiştir [54], [56].

2.2.1.2 Radyoterapi Tedavisi

Radyoterapi, cerrahi sonrasında uygulanan standart tedavi yöntemlerinden biridir ve genellikle 4-6 hafta içinde başlar, 6-7 hafta boyunca uygulanır. Standart fraksiyonel doz olan 60 Gy, tümörün hedeflenmesine olanak sağlar [57]. Radyo cerrahi (Gamma Knife, CyberKnife) gibi odaklanmış yöntemler, cerrahi ile erişilemeyen ya da kritik bölgelerde yer alan tümörlerde etkili olabilir [58]. Ancak, tümörün hipoksik mikroçevresi radyoterapiye direnci artırır ve bu sorunu aşmak için brakiterapi, termoterapi ve bor nötron yakalama terapisi gibi yenilikçi yaklaşımlar araştırılmaktadır. Tüm bu yöntemlere rağmen, radyoterapi sonrası sağkalım süresi genellikle bir yılı geçmemektedir [59]. Radyasyon ışınları, hücrelerin DNA'sı ile doğrudan etkileşime girerek hasara yol açabileceği gibi, su moleküllerinden reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir ve bu ROS'lar DNA lezyonlarına neden olabilir [60].

2.2.1.3 Kemoterapi Tedavisi

Kemoterapide temozolomid (TMZ), GBM tedavisinde standart bir ajan haline gelmiştir. TMZ'nin, MGMT (O6-metilguanin-DNA metiltransferaz, DNA hasarını tamir eden bir enzim) promotör metilasyonu olan hastalarda daha etkili olduğu görülmekte ve bu durum, hastaların tedaviye yanıtını belirlemede önemli bir faktör olarak öne çıkmaktadır [57]. Alternatif olarak karmustin içeren Gliadel gofretler ve klorokin gibi ajanlar da kullanılabilir. Deneysel tedavi yaklaşımları arasında anti-VEGF monoklonal antikorlar (örneğin Bevacizumab), EGFR ve mTOR inhibitörleri gibi hedefe yönelik tedaviler ile kişiselleştirilmiş antitümör aşılı yer almaktadır. GBM tedavisindeki bu çoklu modalite yaklaşımları, sağkalımı uzatma ve yaşam kalitesini artırma hedefleriyle sürekli olarak geliştirilmektedir [61], [62].

Çoğu ilaç kan-beyin bariyerini geçemediği için beyin hücrelerine nüfuz etmesi sınırlıdır. Kan-Beyin bariyeri, kan dolaşımı ile beyin dokusu arasındaki geçişi kontrol eden bir yapıdır. Bu bariyer, beyin ve omuriliği zararlı maddelerden korumak için, belirli moleküllerin kan damarlarından beyin dokusuna geçmesini engeller ve sadece gerekli maddelerin, örneğin oksijen ve glikozun, geçişine izin verir [63]. Bu fizyolojik engel, ilaç penetrasyonunu kısıtlar, dolayısıyla bariyeri geçen ilacın beyin hücrelerine etkin dozda ulaşması yavaşlar veya engellenir. PLGA NP'lerin KBB'den geçebildiği çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle KBB'yi geçmeyi amaçlayan ajanların sağlanmasına yönelik potansiyel stratejilere ve tedavide kullanılan ilaçların, aktivitesini ve biyoyararlanımını arttıracak ve yan etkilere azaltacak, yeni ilaç keşiflerine ve yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.3 Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, bitkileri içerisinde doğal olarak bulunan sekonder metabolit olarak da adlandırılan, bitkileri ultraviyole ışın, mikroplar ve oksidatif stres gibi zararlı etkenlere karşı korumada önemli bir role sahip olan bileşiklerdir. Fenolik asitler meyveler, sebzeler, tam tahıllar ve çay ve kahve gibi içecekler de dahil olmak üzere çeşitli bitkisel gıdalarda yaygın olarak dağılmıştır. Araştırmalar, fenolik bileşiklerin potansiyel antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve immün modülasyon özelliklerine sahip olduğunu göstermiştir. Önleyici bir strateji olarak, birçok bitki kaynaklı fenolik bileşiğin antioksidan özelliği, sağlığın geliştirilmesi ve birçok hastalığın önlenmesine odaklanılarak kapsamlı bir şekilde incelenirken prooksidan özellikleri, kemoterapötik bir strateji olarak çeşitli kanserlerin tedavisinde dikkate değer ilgi toplamıştır [64]. Kanser hücrelerine karşı gösterdikleri yüksek afinite nedeniyle potansiyel terapötik ajanlardır. Karsinogenez sürecini farklı evrelerinde değişken mekanizmalar aracılığıyla kesintiye uğratma potansiyeline sahiptir. Birçok epidemiyolojik çalışmada, fenolik bileşikler açısından zengin meyve ve sebzelerin tüketiminin, çeşitli kanser türleri de dahil olmak üzere çok sayıda kronik hastalığın görülme sıklığını azalttığı gösterilmiştir [65], [66]. Düşük toksisiteleri nedeniyle fenolik bileşik temelli tedavilerin etkisinin araştırılması hızla artmaktadır.

Fenolik bileşikler basit fenolik bileşikler ve daha karmaşık olan çok çeşitli

metabolitlerden oluşur; basit fenolik bileşikler, esas olarak aromatik amino asitler ve benzoik asitlerden türetilen fenolik asitlerdir ve daha karmaşık olanlar, birden fazla benzen halkasından oluşan polifenollerdir. En yaygın diyet polifenolleri flavonoidlerdir. Fenolik bileşikler, flavonoidler ve fenolik asitler olmak üzere iki grupta incelenebilir. Flavonoidler; flavanoller, flavanonlar, flavonoller, flavonlar, izoflavonlar ve antosiyaninler olmak üzere altı alt gruptan oluşan geniş bir fitokimyasal ailesidir. Fenolik asitler de hidroksisünamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olarak iki grupta incelenir[67].

Tablo 2. 1 Fenolik bileşiklerin alt grupları ve örnekler [67].

Grup	Alt Grup	Örnek Bileşikler	Bulunduğu Bitkiler
Fenolik Asitler	Hidroksibenzoik Asitler	Gallik Asit, Vanilik Asit	Yeşil çay, üzüm, nar
	Hidroksisünamik Asitler	Kafeik Asit, Rosmarinik Asit, Ferulik Asit	Kahve, biberiye, tam tahıllar, kereviz
Flavonoidler	Antosiyanidinler	Siyanidin, Delphinidin	Üzüm, böğürtlen, çilek, kırmızı lahana
	Flavonlar ve Flavonoller	Luteolin, Kuersetin	Maydanoz, elma, soğan
	Flavanonlar	Hesperidin, Naringenin	Turunçgiller (portakal, limon)
	Kateşinler	Epikateşin, Kateşin	Yeşil çay, kakao, üzüm çekirdeği
	Proantosiyanidinler	Polimerik kateşinler	Kakao, tarçın, elma kabuğu
	İzoflavonoidler	Genistein, Daidzein	Soya fasulyesi, mercimek, nohut

2.3.1 Kanserde Fenolik Asitler

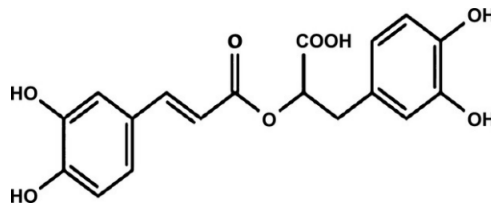
Düşük toksisiteleri nedeniyle fenolik bileşik temelli tedavilerin etkisinin araştırılması hızla artmaktadır. Araştırmalar, fenolik bileşiklerin potansiyel antioksidan, antiinflatuar, antiapoptotik ve immün modülasyon özelliklerine sahip olduğunu göstermiştir [68].

Fenolik bileşikler, karsinogenez sürecini farklı evrelerinde değişken mekanizmalar aracılığıyla kesintiye uğratma potansiyeline sahiptir [69]. Kızılcık Tozu Ekstratı (CBPE (cranberry powder extract)) ile yüklenmiş ve yüzeyi Kitosan ile modifiye edilmiş PLGA nanopartikülleri kolon kanserini hedeflemek için kullanılmıştır [70]. Kızılcık tozu ekstraktı (CBPE), bol miktarda polifenol, serbest radikalleri temizleyen ve hücresel hasarı azaltabilen güçlü antioksidanlar içerir. Kanser hücrelerine karşı gösterdikleri yüksek afinite nedeniyle potansiyel terapötik ajanlardır. Kolon kanseri HT-29 hücrelerinde, 5, 10 ve 20 mikromol/L dozlarındaki rosmarinik asitin (RA), 12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA) kaynaklı (siklooksijenaz-2) COX-2, promotörünün aktivitesini ve protein seviyelerini azalttığı bildirildi [71]. Cilt Kanseri ve Melanomda hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) mRNA ekspresyonlarındaki artış, RA'nın topikal uygulamasıyla tersine çevrilmiştir; bu, RA'nın, antiinflamatuvar ve aynı zamanda antioksidan etki uygulayarak cilt tümörlerine karşı etki ettiğini göstermektedir [19]. Oral olarak uygulanan RA'nın antitümör etkisi, İsviçre albino farelerinde 7,12-dimetilbenz (a)antrasen (DMBA) kaynaklı cilt karsinogenezinde değerlendirilmiş ve DMBA'nın 15 hafta boyunca topikal olarak tek başına uygulanmasıyla %100 tümör oluşumu gözlenmiştir. RA uygulaması tümör oluşumunu azalttığı, antioksidan durumu olumlu şekilde modüle ettiği ve apoptotik belirteçlerdeki (p53, Bcl-2, kaspaz-3 ve kaspaz-9) DMBA'nın neden olduğu değişiklikleri normalleştirdiği kanıtlanmıştır [20]. Akciğer Karsinomu A549 hücrelerinde, RA %50 inhibisyon gösterdiği ve bu hücrelerde COX-2 aktivitesini inhibe ettiği kanıtlanmıştır [21]. İnsan hepatoma HepG2 hücrelerinde RA, apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonunu arttırdı ve apoptozu indükledi, böylece hepatoselüler karsinoma karşı umut verici bir aday olduğunu gösterilmiştir [22]. İnsan meme kanseri MCF7 hücre hattında, RA'nın DNA metiltransferaz aktivitesini inhibe ettiği bildirildi [23]. Kanserde, DNA metilasyon modeli anormal değişikliklere uğrar ve bu da çok çeşitli tümör baskılayıcı genlerin promoter hipermetilasyonuna maruz kalmasına ve transkripsiyonel olarak sessiz hale gelmesine neden olarak tümör oluşumuna yol açar. Bu nedenle, DNA metiltransferazın inhibisyonu bu etkiyi tersine çevirebilir ve kansere karşı potansiyel terapötik değere sahip olabilir. İnsan glioma hücreleri üzerinde RA ve

quercetin'in Hsp-siRNA transfeksiyonu ile birlikte kombine tedavisi, Hsp27 ekspresyonunu baskıladı ve kaspaz-3 aktivitesini arttırdı, bu da RA'nın glioblastoma tedavisi için güçlü bir kombinatorial ajan olduğunu gösterdi [24], [25].

2.3.2 Rosmarinik Asit

Hidroksisinnamik asitler arasında yer alan Rosmarinik asit (RA), 3,4-dihidroksifenilasetik asit, doğal olarak oluşan bir kafeik asit esteridir[72] . Adını biberiyeden alan rosmarinik asit, biberiye, adaçayı, nane ve fesleğen dahil olmak üzere birçok bitki türünde bulunan yaygın bir fenolik bileşiktir. Birçok çalışma, kanser, diyabet, inflamatuvar bozukluklar, nörodejeneratif bozukluklar ve karaciğer hastalıkları dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda RA'nın çoklu terapötik faydalarını doğrulamıştır [73]. Birçok çalışmada, RA'nın anti-plazmodik, anti-viral ve anti-bakteriyel bir ilaç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, antiviral, antiinflamatuvar, antiproliferatif ve yüksek antioksidan kapasitesi nedeniyle bu doğal polifenol, kanser tedavisi araştırmalarında dikkat çekmektedir [14]. Rosmarinik asit, apoptozun indüklenmesi ve hücre proliferasyonu, metastaz ve anjiyogenezin inhibisyonu gibi antikanser özelliklere sahip potansiyel bir kemoterapötik ajandır. Çalışmalar RA'nın antikanser aktivitesi, inflamatuvar yanıtlar, antioksidan denge, tümör başlatılması ve ilerlemesi çeşitli kanserler üzerinde etkili olabileceğini göstermiştir [16].



Şekil 2. 5 Rosmarinik asit kimyasal yapı gösterimi [72]

RA'nın ($C_{18}H_{16}O_8$) kimyasal yapısı hidroksisinnamik asitten türetilir ve rotasyonla oluşturulan R ve S enantiyomerlerinden oluşan kiral bir merkeze sahiptir. RA, molar kütlesi 360,2 g/mol ve erime noktası 171-175 °C olan kristalimsi bir katı olarak görünür. RA, hafif hidrofilik yapıya sahip, oldukça lipofilik bir bileşiktir ve bu nedenle organik solventlerde maksimum çözünürlük sergiler [74].

Tablo 2. 2 Rosmarinik asit'in özellikleri[74].

Molekülün adı	Rosmarinik asit
Ağırlık	360.31 g/mol
Moleküler formülü	C ₁₈ H ₁₆ O ₈
Mp	171-175 °C
Depolama Sıcaklığı	2-8 °C
Çözünürlük	DMSO, etanol gibi organik çözücülerde
Form	Katı
Renk	Açık sarıdan beyaza doğru
Suda Çözünürlük	Suda düşük çözünürlük (<1 mg/mL)
Kararlılık	Uygun koşullarda stabil

Rosmarinik asit (RA), farklı kanser türleri üzerinde yapılan laboratuvar çalışmalarıyla çok yönlü antikanser etkiler sergilemektedir. Meme kanseri, glioma, melanoma ve karaciğer kanseri gibi çeşitli kanser türleri üzerinde yapılan incelemeler, RA'nın kanser hücreleri üzerindeki güçlü biyolojik etkilerini ortaya koymuştur[75]. Bu etkiler arasında hücre döngüsünün belirli aşamalarda durdurulması, programlanmış hücre ölümünün (apoptoz) tetiklenmesi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin artırılması, metastazın engellenmesi ve inflamasyonla ilişkili göstergelerin azaltılması gibi mekanizmalar bulunmaktadır [74]. Araştırmalar, RA'nın genellikle doz bağımlı bir şekilde etkili olduğunu, yani uygulanan doz arttıkça kanser hücrelerine karşı daha güçlü sonuçlar elde edildiğini göstermiştir (Tablo2.3). Örneğin, meme kanseri hücrelerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231), RA'nın G2/M fazında hücre döngüsünü durdurarak apoptoza neden olduğu bildirilmiştir. Kolorektal kanser hücrelerinde (HCT116 ve HT29) ise ROS seviyelerini artırdığı ve inflamasyonu baskıladığı gözlemlenmiştir [76]. Glioma hücre hatlarında (U87 ve C6) yapılan çalışmalar, RA'nın mitokondriyal membran potansiyelini düşürerek hücre invazyonunu önlediğini göstermektedir. Bunun yanı sıra, karaciğer kanseri hücrelerinde (HepG2 ve Huh7), RA'nın hücre çoğalmasını

yavaşlatıcı ve anti-anjiyojenik özellikler sergilediği belirtilmiştir.

Tablo 2. 3 Rosmarinik asidin farklı kanser hücre hatlarındaki etkileri

Kanser Türü	Hücre Hattı	Uygulanan RA Dozu (µg/mL)	Bulgular	Kaynaklar
Meme Kanseri	MCF-7, MDA-MB-231	9, 18, 36	Apoptoz indüksiyonu, G2/M fazında hücre döngüsü durması	[76], [77], [78]
Kolorektal Kanser	HCT116, HT29	7.2, 14.4, 28.8	ROS üretimi artışı, inflamasyon belirteçlerinde azalma	[78]
Akciğer Kanseri	A549, H1299	3.6, 7.2, 18	Proliferasyonun baskılanması, metastazın önlenmesi	[79], [80]
Melanom	A375, SK-MEL-28	10.8, 21.6, 32.4	DNA hasarının artışı, hücre ölüm oranının yükselmesi	[81]
Prostat Kanseri	LNCaP, PC3	9, 18	Androjen reseptör yollarının baskılanması, hücre büyümesinde azalma	[78]
Glioma	U87, C6	18, 36, 72	Hücre invazyonunun baskılanması, mitokondriyal membran potansiyelinde azalma	[82]
Cilt Kanseri	HaCaT, A431	5.4, 10.8, 21.6	Keratinosit proliferasyonunun baskılanması, apoptozun indüklenmesi	[83]
Pankreas Kanseri	PANC-1, MiaPaCa-2	14.4, 28.8, 43.2	Hücre büyümesinin durdurulması, inflamatuvar sitokinlerin azalması	[84]
Karaciğer Kanseri	HepG2, Huh7	3.6, 9, 18	Hücre çoğalmasının inhibisyonu, anti-anjiyojenik etkiler	[85]

Tablo 2.3'teki bu bulgular, rosmarinik asidin, çeşitli biyolojik mekanizmalar aracılığıyla kanser hücrelerini hedefleyerek etkili bir tedavi adayı olabileceğini göstermektedir. Ancak, RA'nın klinik kullanım potansiyelinin doğrulanması için ileri düzeyde araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4 İlaç Taşıyıcı Sistemler

"Nano" terimi, Yunanca'da "cüce" anlamına gelen "nanos" kelimesinden türetilmiştir. Bir nanometre(nm) metrenin milyarda biri olarak çevrilir. Nanoteknolojiyi, boyutları 100 nm altında olan atomik, moleküler veya makromoleküler düzeylerde araştırma ve geliştirme için gerekli yeni fonksiyonel özelliklere sahip yapıları araştıran ve ilgilenen disiplinler arası olarak tanımlamaktadır.

Richard Feynman, nanoteknolojinin öncüsü olarak kabul edilmektedir. 1959 yılında, boyutları 1 ile 100 nanometre arasında değişen malzemelere "nanomalzeme" terimini ilk kez öneren kişi Feynman'dır. Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü'nden bir akademisyen olan Feynman, bir dersinde atomları tek tek ayırmak ve kontrol etmekten bahsetmiştir. Feynman'ın düşüncelerinden ilham alan Norio Taniguchi, 1974 yılında "nanoteknoloji" terimini tanımlayan ilk kişidir. Taniguchi, nanoteknolojiyi "materyalleri tek atom düzeyinde ayırma, birleştirme veya şekil değiştirme" olarak tanımlamıştır [86]. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) sayesinde, atomların bireysel görüntülerinin alınması mümkün olmuştur [87]. Günümüzde çok sık bir arada duyulan ilaç taşıyıcı sistemler ve nanoteknoloji terimleri insan hayatındaki sorunlara çözümler sunmaktadır. Tedavide En önemli sorunlardan biri istenilen ilacın etki göstereceği yapıya taşınmasıdır.

Etkin maddenin belirli bir süre içinde etkisini gösterememesi veya istenmeyen dokularda etki göstermesi, tedavi sürecini zorlaştıran önemli bir sorundur. Ayrıca, ilacın vücutta bulunan fizyolojik bariyerleri aşarak hedef bölgeye ulaşamaması da başka bir büyük problemdir. Nano ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesi, kan-beyin bariyeri, bronşöller gibi solunum yolu bariyerleri ve derideki sıkı bağlantılar

gibi fizyolojik engelleri aşarak ilaçların hedef dokuya etkili bir şekilde ulaşmasını sağlamada kritik bir rol oynamaktadır. Nanopartikül tabanlı ilaç taşıma yöntemleri, ilacın sadece hedef bölgeye etki etmesi, kanda uzun süre etkin kalması ve istenilen hızda yeterli miktarda salınım yapması gibi önemli avantajlar sunmaktadır [88]. Hedeflenen nanopartiküllerin kanser tedavisinde kullanılmasının avantajları [89];

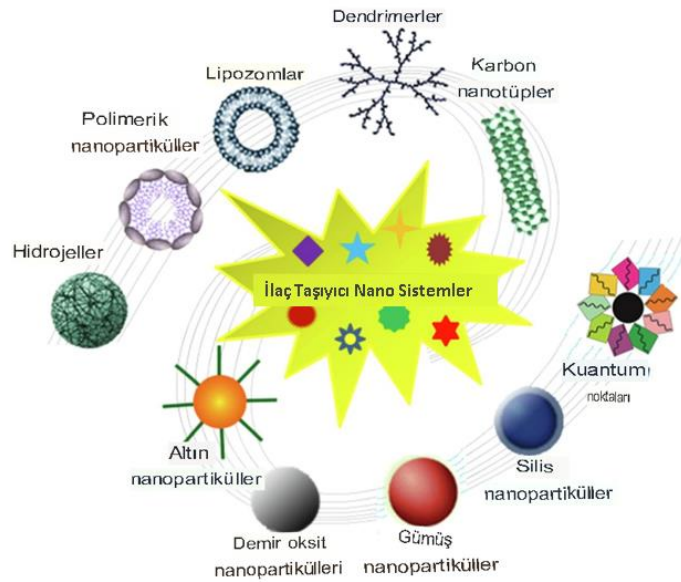
1. Nano boyutları sayesinde damarlar arasından kolayca geçerek kan dolaşımına dahil olabilirler.
2. Boyutları küçüldükçe yüzey alanları artar, bu da çözünürlüklerinin orantılı olarak artmasını sağlar.
3. Nanopartiküllerin biyoyararlanımını artıran modifikasyonlarla çözünürlük ve absorpsiyon artırılabilir.
4. İlaç, istenilen hücre, doku veya organa yönlendirilerek hedeflenebilir.
5. Polietilen glikol (PEG) veya Polioksietilen (POE) gibi moleküller kullanılarak ilacın dolaşımda kalma süresi uzatılabilir.
6. Sıcaklık ve pH gibi faktörlere duyarlı maddelerle modifiye edilen nanopartiküller, ilaç ve görüntüleme maddeleriyle birlikte hedefleme molekülleri eklenerek hedeflenebilir.
7. Teranostikler, aynı anda hem görüntüleme hem de etkin madde taşıyabilen nano ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Bu sistemler, ilacın salınımı ve dağılımını takip etmemizi sağlayarak tedavinin etkinliğini izlememize olanak tanır.
8. Bir nano ilaç taşıyıcıya birden fazla etkin madde ve hedefleme molekülü bağlanabilir [28].

Nano taşıyıcıların ilaç salınımı için kullanılması bazı zorluklarla birlikte gelir. Örneğin, nanopartiküllerin üretimi ve saklanması karmaşık olabilir. Ayrıca, bazı nanopartiküller belirli ilaç salınımı uygulamaları için uygun olmayabilir. Hücre çekirdeğini çevreleyen zarları geçme potansiyeli, genetik hasara ve mutasyonlara yol açarak hücrede istenmeyen zararlı etkiler oluşturabilir.

İlaçların hedeflenen bölgeye selektif olarak yönlendirilmesi, ilaç taşıyıcı

sistemler aracılığıyla yapılmaktadır. İlaçların hedeflenmesinin iki önemli avantajı vardır. İlk olarak, ilacın hedef bölgeye doğru hızda ve etkin bir şekilde salınımı sağlanarak tedavinin verimliliği artırılır. İkinci olarak, ilacın çözünürlüğü artırılarak dozajı azaltılabilir, bu da toksik etkilerin önlenmesine yardımcı olur ve ilacın sadece hedef dokuda salınmasını sağlar. Bu özellikler sağlandığında, ilaç daha düşük dozlarda daha etkili olabilir, böylece istenmeyen yan etkiler en aza indirilir.

Hedeflendirilmiş nanopartiküller ile kanserin tedavisi umut vadeden bir durumdur. Nanopartiküller içinde saklı olarak kana verilen kanser ilacı serbest olmadığı için kandaki sağlıklı hücrelerle etkileşmez ve onlara zarar vermez. Ayrıca nanopartiküllerin boyutları sağlıklı dokudaki kan çeperi deliklerinden daha büyük olduğu için ve ilaç partikül içinde paketli olduğu için kan dolaşımından sağlıklı dokulara geçip yan etki gösteremez. Dolaşımda kalan nanopartikülün geçebileceği boyutlarda delikleri olan kanserli dokuya gelince dolaşımdan dışarı çıkar ve kanserli dokuda ilacın toplanmasını sağlar. Bu şekilde daha az ilaçla bütün kanserli hücreleri öldürebilecek dozda ve ilacın yan etkisi görülmeden kanserin tedavisi gerçekleşmiş olur.



Şekil 2. 6 Nanoteknoloji ile ilaç taşıma sistemleri: nanotaşıyıcı türleri [89]

2.4.1 Nanopartiküller

Polimerler, lipidler, altın nanopartikülleri, dendrimerler, miseller, siklodekstrinler ve inorganik bazlı yapılar nanotaşıyıcı sistemler geliştirmek amacıyla üzerinde en fazla çalışma yapılmış olan nanopartiküler sistemler arasında sayılabilirler [90].

Lipozomlar temel bileşenleri fosfolipitler olması sebebiyle hidrofilik ve hidrofobik bölgeler içeren suda ve yağda eriyen molekülleri taşıyabilme özelliğine sahip amfifilik yapıda küçük küresel şekilli veziküllerdir. Lipozomların hidrofilik ve lipofilik yapısı ve içerik açısından hücre zarına benzerlik göstermelerinden dolayı kan dolaşımına girdiğinde plazma proteinleriyle kolaylıkla etkileşebilir. Araştırmacı tarafından kimyasal içeriklerinin toksik olmadığına gösterilmiş olması nedeni ile kanser araştırmalarında ilaç taşıyıcı olarak kullanılmaktadır [91].

Tablo 2. 4 Kullanıma girmiş olan lipozom yapıları ilaçlar [92- 96] [92], [93], [94], [95], [96]

Ürün Adı	Etkin Madde	Kullanım Alanı
Ambisome	Amfoterisin B	Fungal enfeksiyonlar
DaunoXome	Daunorubisin	Kan tümörleri
Doxil	Doksorubisin	Kaposi's sarkoma, over/meme kanseri
Lipo-dox	Doksorubisin	Kaposi's sarkoma, over/meme kanseri
Myocet	Doksorubisin	Siklofosfamid ile kombine olarak metastatik meme kanserinde
Visudyne	Verteporfin	Yaşa bağlı moleküler dejenerasyon, patolojik miyop, oküler histoplazmozis
Depocy	Sitarabin	Menenjit
DepoDur	Morfin sülfat	Ağrı tedavisi
Epaxal	İnaktif Hepatit A virüsü	Hepatit A
Inflexal V	İnaktif influenza virüsü	İnfluenza

FDA onaylı İlk Nano -İlaç olan lipozom içinde kapsüllenmiş doksorubisin etken maddesi içeren Doxil (Lipozom (Doxorubicine) -PEG) kapalı lipid küre sürekli ve uzun süreli ilaç salımı sağlar [97]. Bir diğer lipozomal ilaç, irinotekan formülasyonu olan Onivyde yakın zamanda gemsitabine dirençli metastatik pankreas kanseri olan hastalarda kullanım için onaylanmıştır.

2.4.2 Polimerik Nanopartikül

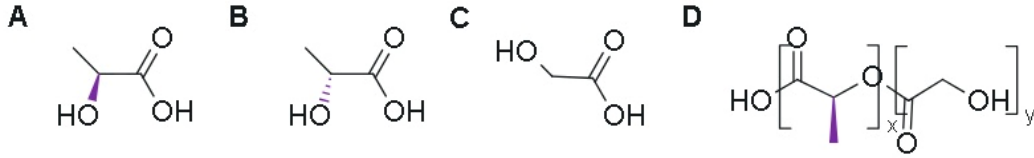
Polihidroksialkananoatlar (PHA), siklodekstrinler (CD'ler) ve poli- (laktid-ko-glikolik asit) (PLGA) çekirdek üretimi için en yaygın kullanılan polimer malzemelerdir. Kanseri dokusunda nanopartiküllerin birikmesine neden olan toksik olmayan hidrofilik dış kabukları, yüzey modifikasyonunda yaygın olarak uygulanan polivinil alkol (PVA), PEG ve monometoksi poli- (etilen glikol) (mPEG) gibi polimerler üst seviyede kan biyolojik uyumluluğu sağlar [98]. Anti-kanser ilaçları içeren hidrofobik bir polimer bazlı çekirdek kanda daha uzun süre kalıcılık sağlar bu da sistemik dolaşım süresi sağlar. Hidrofilik bir dış kabuktan oluşur. Polimerik nanopartiküller avantajları; stabilite, biyoyuumluluk, biyobozunurluk, yüzey modifikasyonu, aktif ve pasif taşımaya uygun olma ve tümör çevresindeki değişkenlere bağlı olarak kesintisiz ilaç salınımı sağlar [99], [100].

Tablo 2. 5 İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerler [101].

Polimerler	Polimer Grupları	Numuneler
Doğal ve biyolojik olarak parçalanabilenler	Proteinler	Albumin, Kolajen, Jelatin, Sığır ve İnsan Serum Albuminleri (BSA ve HSA)
	Polisakkaritler	Selüloz, dekstran, kitozan, Kondroitin sülfat, aljinat, nişasta, hyalüronik asit
	Poliamidler	Poli amino asit, polipeptid
Sentetik ve biyolojik olarak parçalanabilenler	Polyesterler	Poli(laktik asit) Poli(glikolik asit) Poli(laktik-ko-glikolik asit)* Poli(kaprolakton) Poli(dioksanon) Poli(hidroksibütirat)
	Polianhidridler, Poliortoesterler, Polifosoesterler	Polifosfat, polifosfonat, polifosfit
Sentetik ve biyolojik olarak parçalanamayanlar	Silikon elastomerler, Poli(etilen-ko-vinil asetat), Poliakrilatlar	Poli(metil metakrilat)

Poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA), ilaç taşıma uygulamalarında yaygın olarak tercih edilen, biyolojik uyumluluğa sahip ve biyolojik ortamda kolayca parçalanabilen bir polimerdir [102]. PLGA, poli-laktik asit (PLA) ve poli-glikolik asit (PGA) birleştirilerek oluşturulmuş bir kopolimerdir (Şekil 2.7) [103]. PLA, D

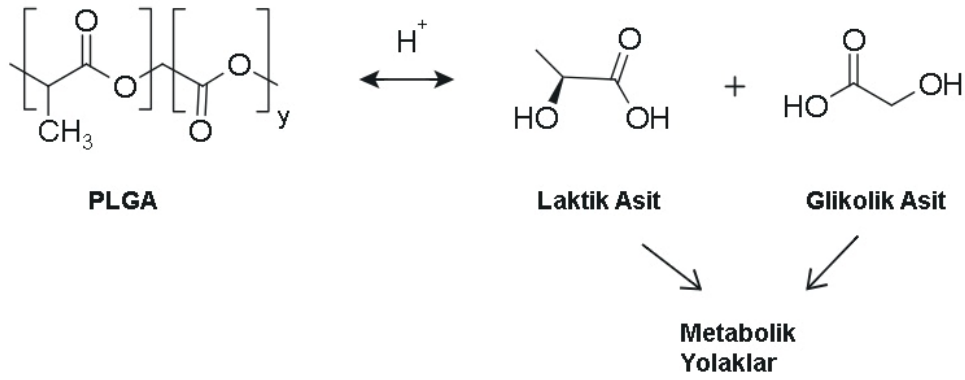
ve L formundaki laktik asit birimlerinden oluşan bir yapıya sahipken, bu birimlerin kombinasyonu PLGA'da farklı oranlarda bulunur [104]. PLGA'nın biyolojik sistemlerde çözünme yeteneği, özellikle hidrolitik çözünme özellikleri sayesinde, bu polimeri ilaç taşıma sistemlerinde çok kullanışlı kılmaktadır [105], [106].



Şekil 2. 7 L-PLA (A), D-PLA(B), PGA(C), PLGA (D)'nin kimyasal yapıları x; Laktik asit üniteleri sayısını, y; glikolik asit ünitelerinin sayısını göstermektedir [107].

PLGA'nın hidrolitik çözünmesi, ester bağlarının su ile etkileşime girmesi sonucu gerçekleşir ve bu süreç, polimerin biyolojik olarak parçalanmasını sağlar[108]. Sonuç olarak, PLGA moleküllerinin parçalanmasıyla açığa çıkan laktik asit ve glikolik asit, vücutta doğal olarak metabolize edilip zararsız bir şekilde atılır (Şekil 2.8). Bu özellik, PLGA'yı güvenli ve etkin bir taşıyıcı materyal haline getirir. Nanopartikül formlarında PLGA, ilaçların kontrollü ve hedeflenmiş bir şekilde salınmasını sağlar, bu da tedavi süreçlerini daha verimli hale getirir. PLGA'nın biyolojik uyumluluğu ve parçalanabilirliği, kanser tedavisi gibi hassas tedavi alanlarında özellikle değerli bir özellik olarak öne çıkar [107].

Üretilebilecek PLGA nanopartikül sistemlerinde etken madde partikül içine veya yüzeye adsorpsiyonla enkapsüle edilebilir, ya da partikül içinde çözündürülebilir [109]. Polimerik bir ilaç taşıma sistemi olan PLGA ilacın biyoyararlanımını ve etki süresini arttırarak, toksisitesini azaltır ve uzun süreli salım yapılmasını sağlar. Diğer nano ilaç taşıyıcılarla karşılaştırıldığında, PLGA daha yüksek ilaç yükleme kapasitesine ve kararlılığa sahip EMA (European Medicine Agency) ve FDA (Food and Drug Administration) onaylı bir polimerdir. PLGA, poliester omurgasının hidrolitik olarak parçalanmasıyla çözünmektedir. PLGA (Polilaktik-ko-glikolik asit), biyolojik olarak parçalanabilen biyoyumlu nişasta ve kitosan gibi polimerlerden oluşur [110], [111]. PLGA molekülü içerdiği laktik asit ve glikolik asit yapıları arasındaki ester bağlarının yıkılması sonucunda PLGA hidrolize olur ve H₂O şeklinde Krebs döngüsü vasıtasıyla vücuttan atılır [112].



Şekil 2. 8 PLGA hidrolizi [113].

2.4.3 Glioblastoma Tedavisinde Polimerik Nanopartiküller

GBM tümörlerinde RB, p53 ve RTK/RAS/PI3K üç kritik sinyal yollarının mutasyonları sık görülen genetik değişikliklerdir. Bu hücre sinyalleşmesinin karmaşıklığı, kanserle mücadele edebilecek sinyal moleküllerinin işlevini hedefleyebilen ve modüle edebilen terapötik ajanların, özellikle doğal ürünlerin antikanser potansiyelinden yararlanılarak tedavi stratejisi geliştirmek umut verici bir terapötik yaklaşımdır [16], [81]. Rosmarinik asitin'in, hızlı metabolizmasını önlemek, insan vücudunun diğer bölümlerine nüfuz etmesini sağlamak ve biyoyararlanımını arttırmak için tasarlanan farmasötik formülasyonlar da gelecekteki araştırmalar için kritik bir konudur. Böbrek yoluyla hızla atılır ve sistemik absorpsiyon derecesi de düşüktür, bu da RA'nın yüksek etkinlik ve potansiyele sahip olmasına rağmen tıbbi kullanımını sınırlar [27].

Poli laktik- ko -glikolik asit (PLGA), terapötik ajanları birleştirmek için ilaç taşınmasında yaygın olarak kullanılan, güvenilirliği yüksek, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak uyumlu bir polimerdir. Nanopartiküller, çok küçük boyutları sayesinde vücutta hedef bölgelere daha etkili bir şekilde taşınabilirler. Nanopartiküller içinde paketli olarak kana verilen kanser ilacı serbest olmadığı için kandaki sağlıklı hücrelerle etkileşme ve onlara zarar verme potansiyeli daha düşüktür. Bu, sağlıklı hücrelere minimal zarar vererek kanser tedavisinin etkinliğini artırabilir. PLGA özel stratejilerle ilaçları taşıyabilen ve bu ilaçları doğrudan kanser hücrelerine yönlendirebilen sistem olarak geliştirilebilir [113].

2.4.3.1 Pasif Hedeflendirme

Pasif hedefleme, kanser tedavisinde nanopartiküllerin tümör dokularına yönlendirilmesini sağlayan bir mekanizmadır. Bu hedefleme, tümörlerin anormal kan damar yapıları ve yüksek geçirgenlik özellikleri sayesinde gerçekleşir [114]. Bu duruma EPR (Artmış Geçirgenlik ve Alı Konma) etkisi denir ve bu etki, nanopartiküllerin tümör bölgesine sızmasını kolaylaştırır. Ancak katı tümörlerde, yüksek interstisyel basınç, ilaçların etkili bir şekilde dağılmasını engeller. Bu nedenle, daha büyük ve uzun süre dolaşımda kalan nanopartiküller (örneğin 100 nm boyutlarındaki parçacıklar), tümör bölgesinde daha fazla birikme eğilimindedir [115].

Bununla birlikte, biyolojik bariyerler nanopartiküllerin hedeflenen bölgelere ulaşmasını zorlaştırabilir. Vücudun bağışıklık sistemi, yabancı maddeleri tanıyarak bunları uzaklaştırmaya çalışır [116]. Özellikle, karaciğer, dalak ve kemik iliği gibi organlar, nanopartiküllerin birikmesine neden olabilir. Bu sorunu aşmak için nanopartiküller, dış yüzeylerine PEG (Polietilen Glikol) kaplanarak, bağışıklık sisteminin bunları tanıyıp yok etmesini engeller ve nanopartiküllerin vücutta daha uzun süre dolaşmasını sağlar [117].

Özetle, pasif hedefleme ve EPR etkisi kanser tedavisinde nanopartiküllerin tümöre yönlendirilmesinde önemli bir rol oynar, ancak biyolojik engellerin aşılması için nanopartiküllerin özel kaplamalarla korunması gereklidir [118].

2.4.3.2 Aktif Hedeflendirme

Aktif hedefleme, ilaç taşıma sistemlerinin hedeflenen doku veya organlara özgül bir şekilde yönlendirilmesini sağlamak için yapılan bir stratejidir [119]. Bu süreçte nanopartiküllerin yüzeyi, hedeflenen hücrelerin özelliklerine uygun şekilde modifiye edilir. Hedefleme stratejileri arasında kimyasal faktörler (pH değişiklikleri, reaktif oksijen türleri) ve fiziksel faktörler (manyetik alanlar, ultrason gibi) yer alır. Ayrıca, belirli hücre reseptörlerine bağlanabilen ligandlar kullanılarak nanopartiküller, tedavi edilen bölgelere doğrudan yönlendirilebilir [120]. Bu sayede, tedavi ajanları hedef hücrelere daha verimli bir şekilde taşınarak, yan etkiler minimize edilir ve tedavi etkinliği artırılır. Özellikle kanser tedavisinde bu yöntem, tümör hücrelerine doğrudan etki etmek ve sağlıklı dokuları korumak açısından

büyük önem taşır [121]. Örneğin, Rosmarinik asit gibi biyolojik olarak aktif bileşiklerin nanopartiküllerle yüklenmesi, bu bileşiklerin kanser hücrelerine daha etkili bir şekilde ulaşmasını ve tedavi edici etkisini artırmasını sağlar. PLGA gibi biyolojik olarak uyumlu polimerler, bu tür ilaç taşıma sistemlerinde sıklıkla kullanılır ve tümör hücrelerine yönelik başarılı hedefleme stratejileri oluşturulmasına yardımcı olur. Bu yaklaşım, kanser tedavisinde yeni nesil tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır [122], [123].



2.5 Materyal**2.5.1 Kullanılan Cihazlar**

- 2.5.1.1 Biyogüvenlik Kabini- Hedlab XPROII
- 2.5.1.2 CO₂ İnkübatör- Biosan ES20
- 2.5.1.3 Çalkalayıcı- Biosan Environmental Shaker ES20
- 2.5.1.4 Çoklu Manyetik Karıştırıcı- IKA
- 2.5.1.5 Distile Su Cihazı- Sartorius Arium Pro
- 2.5.1.6 Elisa Reader- BioTek PowerWave XS2
- 2.5.1.7 FT-IR- Thermo Scientific Nicolet iS10
- 2.5.1.8 Hassas Terazi- Shimadzu
- 2.5.1.9 Invert Mikroskop- Olympus CKX41
- 2.5.1.10 Liyofilizatör- Telstar Cryodos
- 2.5.1.11 Manyetik Karıştırıcı- Variomag Mono
- 2.5.1.12 Mini Santrifüj Cihazı- Hermle Z 206 A
- 2.5.1.13 Nanodrop- Thermo Scientific
- 2.5.1.14 Otoklav- Hirayama
- 2.5.1.15 Peristaltik Pompa- Masterflex Core Palmer
- 2.5.1.16 pH metre- Hanna
- 2.5.1.17 Real Time PCR Cihazı- AriaMx Real-Time PCR System
- 2.5.1.18 Santrifüj Cihazı- Beckman Coulter Allegra X-30 R
- 2.5.1.19 Sıvı Azot Tankı- International Cryogenics, Inc. 20R
- 2.5.1.20 Sonikatör- Bandelin Sonoplus
- 2.5.1.21 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)- ZEISS EVO LS10
- 2.5.1.22 UV-Vis Spektrofotometre- Shimadzu UV- 1800
- 2.5.1.23 Vorteks- Velp Scientifica

2.5.1.24 Zeta Sizer- Malvern ZEN 3600 Nano ZS

2.5.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

- 2.5.2.1 0,2 mikrolitrelik PCR tüpü- Axygen 15216383
- 2.5.2.2 15ml'lik non-steril falkon tüpler- ISOLAB 078.02.001
- 2.5.2.3 15ml'lik steril falkon tüpler-CAPP 5100015C
- 2.5.2.4 2 ml mikrosantrifüj tüpü- NEST 620011
- 2.5.2.5 24 kuyulu plaka- SPL 32024
- 2.5.2.6 50 ml'lik non-steril falkon- ISOLAB
- 2.5.2.7 50 ml'lik steril falkon- CAPP 5100059C
- 2.5.2.8 6 kuyulu plaka- SPL 32006
- 2.5.2.9 96 kuyulu mikroplaka- SPL 32096
- 2.5.2.10 96 kuyulu PCR mikroplaka- NEST 402101
- 2.5.2.11 Beher- Isolab
- 2.5.2.12 Elektrolit küvet (zeta cell)- Malvern DTS1070
- 2.5.2.13 Filtre Kâğıdı- BIO-RAD 1703965
- 2.5.2.14 Hücre dondurma tüpleri- CAPP 5042000C
- 2.5.2.15 Hücre Kültür Plakları(T25, T75)- SPL703025,75
- 2.5.2.16 İnce uçlu pens
- 2.5.2.17 Parafilm- Bemis PM-996
- 2.5.2.18 Serolojik Pipetler (1ml, 2ml, 5ml, 10ml ve 25ml)- CAPP
- 2.5.2.19 Steril plastik pipet ucu 10 µl- ISOLAB I.005.01.001.901
- 2.5.2.20 Steril plastik pipet ucu 1000 µl- CAPP 4130135C
- 2.5.2.21 Steril Tek Kullanımlık Şırınga- Set Medikal
- 2.5.2.22 Steril plastik pipet ucu 200 µl- CAPP 5130070C
- 2.5.2.23 Thoma Lamı- Isolab

2.5.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Nanopartikül Sentezi İçin

- 2.5.3.1 Diklorometan- Sigma Aldrich 34856-2.5 L
- 2.5.3.2 Etanol- ISOLAB 920.027
- 2.5.3.3 Etil Asetat- Sigma Aldrich 27227
- 2.5.3.4 Poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA)- Sigma Aldrich 719862-5G
- 2.5.3.5 Polivinil Alkol- Sigma Aldrich 363138
- 2.5.3.6 Rosmarinik Asit- Sigma Aldrich 536954-5G

2.5.3.7 Tween 80- Sigma Aldrich P1754-500ML

Hücre Kültürü İçin

2.5.3.8 Dimetil sülfoksit- ChemCruz sc358801/Carlo Erba 508002

2.5.3.9 Disodyum Fosfat Dihidrat- Sigma Aldrich 04272

2.5.3.10 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium: High glucose)- Gibco 41966029

2.5.3.11 Fetal Sığır Serum- Thermo/Gibco 10500064

2.5.3.12 Hidroklorik asit- Sigma Aldrich 30721

2.5.3.13 Monosodyum Fosfat- Sigma Aldrich 04270

2.5.3.14 Penisilin/Streptomisin- Sigma Aldrich P4333

2.5.3.15 Sodyum Hidroksit- Sigma Aldrich 71690

2.5.3.16 Sodyum Klorür- Sigma Aldrich 13423

2.5.3.17 Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide %98- Sigma Aldrich M5655

2.5.3.18 Tripan Mavisi- Sigma Aldrich T8154

2.5.3.19 Tripsin-EDTA- Thermo 25200056

Total RNA İzolasyonu İçin

2.5.3.20 cDNA sentez kiti- SensiFAST

2.5.3.21 Direct-zol RNA MiniPrep kiti- Zymo Research R2050

2.5.3.22 Kloroform- Sigma Aldrich 34854-2.5 L

2.5.3.23 Trizol(TRI Reagent)-Zymo Research R2050-1-200

Kantitatif PCR İçin

2.5.3.24 Real Time PCR SYBR Lo-Rox Kit- SensiFAST BIO 94020

2.5.3.25 Steril su DNase RNase Proteaz İçermeyen 100Ml-Multicell 809-115

E

2.5.4 Kullanılan Solüsyonlar ve Tamponlar

3.1.4.1 Tween 80 Çözeltisi

10 ml %3'lük tween 80 çözeltisi için, 9,7 ml PBS (pH=7,4) bulunan 15ml'lik falkon içerisine 300 µl tween 80 katılarak pipetaj yapıldı. Karışımın vortekslenmesiyle homojen tween 80 elde edildi.

45 ml %0,1'lik tween 80 çözeltisi için, %3'lük tween 80 çözeltisinden 1,5 ml alınarak, beher içerisine alınan 43,5 ml PBS (pH=7,4) üzerine eklendi. 0°C derece sıcaklıkta yüksek hızda manyetik karıştırıcıda karıştırılmasıyla homojen %0,1'lik tween 80 çözeltisi elde edildi.

3.1.4.2 Polivinilalkol (PVA) Çözeltisi

100 ml %3 Polivinil Alkol (PVA) çözeltisi hazırlamak için, 3 gram PVA hassas terazi ile tartılıp bir beher içerisine alındı. Ardından, 100 mL distile su eklenerek karışım, 65-75°C arasında bir sıcaklıkta manyetik karıştırıcı ile 2-3 saat boyunca sürekli karıştırılarak homojen bir çözelti haline getirilmiştir. Son olarak, çözelti oda sıcaklığına soğutularak +4 °C saklandı.

45 ml %0,1'lik PVA çözeltisi hazırlamak için ise %3'lük PVA çözeltisinden 1,5 mL alınarak 43,5 mL distile su ile karıştırıldı. Çözelti homojen hale getirildikten sonra kullanıma hazır hale getirildi.

3.1.4.3 Fosfatlı Tampon Çözeltisi (PBS)

Fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisini hazırlamak için 0,5844 gram sodyum klorür (NaCl), 1,1998 gram sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) ve 1,7799 gram disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), hassas teraziyle ölçülüp, 1 litre distile suya eklenmiştir [124]. Çözeltinin pH değeri 7,4 olarak ayarlanırken, bu işlemde sodyum hidroksit (NaOH) ve hidroklorik asit (HCl) kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltinin sterilizasyonu, otoklav yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu çözeltinin hazırlanışı, biyolojik ve hücresel çalışmalar için yaygın olarak kullanılan standart bir protokoldür [125].

3.1.4.4 %10'luk DMEM/High Glikoz Besiyeri

Hücre kültürlerinde kullanılmak üzere DMEM/High Glikoz besiyeri ticari olarak temin edildi. 500 mL'lik hazır DMEM çözeltisinden 44,5 mL alınarak 10 adet 50 mL'lik tüpe bölüştürüldü. Her bir tüpe, %1 oranında (500 µL) penisilin-

streptomisin çözeltisi ve %10 oranında (5 mL) Fetal Bovine Serum (FBS) eklendi. Bu şekilde, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, %89 DMEM içeren tamamlanmış 50 mL'lik besiyeri elde edildi. Hazırlık işlemleri, steril çalışma ortamını sağlamak amacıyla laminar akış kabininde gerçekleştirildi. Besiyerinin kapak kısmı parafilmle kapatılarak, kullanılabileceği kadar muhafaza amacıyla +4°C'ye kaldırıldı. Kullanım öncesinde oda sıcaklığına getirilip hücrelere verildi.

3.1.4.5 Hücre Dondurma Solüsyonu

Hücrelerin düşük sıcaklıklarda canlılıklarını koruyabilmesi için %90 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) içeren bir dondurma mediumu hazırlandı. Bu işlemde, hücreler için besleyici bir ortam sağlayan 9 mL FBS, steril bir kriyo tüpe alındı ve ardından 1 mL DMSO, kriyoprotektan olarak donma sırasında hücre zarını koruyup olası hasarları önlemek amacıyla ilave edildi. U87MG insan glioblastoma hücre hattı, hazırlanan dondurma solüsyonu ile süspanse edildikten sonra kademeli olarak önce -20°C'de, ardından -80°C'de donduruldu, son aşamada ise -196°C'deki sıvı azot tankına aktarıldı. Hazırlık işlemleri, DMSO'nun özelliklerinin bozulmaması ve toksik etkilerinden kaçınmak için karanlık koşullarda ve steril laminar flow kabininde gerçekleştirildi. Bu yöntem hücrelerin canlılığını koruyarak ileri deneysel çalışmalar için güvenli bir şekilde saklanmasını sağladı.

3.1.4.6 MTT Solüsyonu

MTT reaktifi, hücre canlılık testlerinde kullanılan bir tetrazolium tuzu olan 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromürden (MTT) hazırlandı. Hazırlık için, 6 gram MTT tozu hassas terazide tartılıp 10 mL PBS içerisine eklendi. Karışım, 15 mL'lik falkon tüpte vorteksenerek çözülmesi sağlandı ve ardından 0,22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. Çözelti, ışığa duyarlı olduğundan dolayı folyoya sarılarak +4°C'de karanlık ortamda saklandı. Hücrelerin metabolik aktiviteleri sonucu, MTT'nin formazan kristallerine dönüşümü gözlemlenir ve bu sayede hücre canlılığının ölçülmesine olanak tanır.

2.5.5 Farklı Konsantrasyonlardaki Rosmarinik Asit Çözeltileri

Rosmarinik asit stok çözeltisi, 1 mg rosmarinik asit, 10 mL etil asetat içerisinde çözülerek 0,1 mg/ml konsantrasyonunda hazırlandı. Belirtilen konsantrasyonlara

ulaşmak amacıyla sırasıyla 0,1; 0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05; 0,04; 0,03; 0,02; 0,01; 0,009; 0,008; 0,007; 0,006; 0,005; 0,004; 0,003; 0,002; ve 0,001 mg/ml düzeylerine kadar kademeli olarak seyreltildi. Çözeltilerin UV-görünür bölge (UV-Vis) spektrofotometrisi ile analiz edilmesi sonucunda, maksimum absorbands değeri 325,5 nm dalga boyunda gerçekleştiği belirlendi. Elde edilen absorbands verileri, çözeltinin konsantrasyonu ile ilişkilendirilerek standart bir kalibrasyon eğrisi çizildi ve bu eğri analizlerin doğruluğunu artırmak için temel referans olarak kullanıldı.

2.6 Yöntem

2.6.1 Rosmarinik Asit İçin UV-Vis Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Rosmarinik asit çözeltisi, hem etanol (EtOH) hem de etil asetat (EtOAc) kullanılarak hazırlandı. Her iki çözücü ile de çözüm yapmanın amacı, her iki çözücünün rosmarinik asidi çözme özelliklerini karşılaştırmak ve nanopartikül (NP) sentezi için her iki çözücüyü de kullanarak farklı çözücü koşullarında en uygun NP formülasyonunu elde etmektir [126].

Etanol kullanılarak hazırlanan çözelti, 10 ml içerisinde 1 mg rosmarinik asidin tamamen çözünmesiyle elde edilmiştir. Bu stok çözeltiden farklı konsantrasyonlar (0,1 mg/ml ile 0,009 mg/ml arasında) seyreltilmiş ve UV-görünür bölge spektrofotometresiyle absorbands değerleri analiz edilmiştir. Etil asetat çözücüsüyle aynı yöntem uygulanmış, her iki çözücünden elde edilen absorbands sonuçları kullanılarak bağımsız kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Bu analizler, rosmarinik asidin çözücü bazlı davranışlarının anlaşılmasına katkı sağlamaktadır [127].

2.6.2 Rosmarinik Asit İçeren PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi: O/W Emülsiyon Çözücü Uçurma Yöntemi

Rosmarinik asit (RA) ve poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküllerinin hazırlanması için, 3 mg RA ve 75 mg PLGA hassas terazide tartılarak ölçüldü. RA çözeltisi, 0,5 mL etil asetat (EtOAc) içerisinde çözülürken, PLGA çözeltisi ise 1,5 mL EtOAc içerisinde hazırlandı. Sentez işlemi için 4 mL %3'lük Tween 80 çözeltisi 50 mL'lik bir falkon tüpüne, 45 mL %0,1'lik Tween 80 çözeltisi ise 200 mL'lik bir cam behere alınarak manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi [98].

Hazırlanan RA çözeltisi vortekslendikten sonra üzerine 300 µL %3'lük Tween 80 çözeltisi eklendi ve enjektörle çekildi. Bu çözelti, pipetleme yöntemiyle PLGA çözeltisine aktarıldı ve homojen bir karışım elde edilmesi için birkaç kez enjektörle geri çekilip verildi. Nanopartiküllerin oluşumu için bu karışım, buzlu bir beher içerisindeki 4 mL %3'lük Tween 80 çözeltisine sonikasyon altında, enjektörle damla damla eklendi. Karışım, %50 voltajda ve 90 saniye boyunca sonike edildi. Sonikasyon işlemi tamamlandıktan sonra, RANP karışımı enjektöre hızlıca çekildi ve ardından manyetik karıştırıcı üzerindeki 45 mL %0,1'lik Tween 80 çözeltisine karışımın dış fazını oluşturması için 3 dakika içinde damla damla eklendi. Karışım içerisindeki organik çözücülerin buharlaştırılması için beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı ve üzerine delikler açıldı ve 4 saat boyunca karıştırılmaya bırakıldı [128].

Nanopartiküllerin saflaştırılması için çöktürme ve yıkama işlemleri uygulandı. Çöktürme işlemi, 10.000 rpm'de 50 dakika boyunca santrifüjleme yapılarak gerçekleştirildi. Oluşan üst faz bir behere alındı. Yıkama aşamasında, her defasında 35 mL distile su eklenerek nanopartiküller 9.000 rpm hızla 35 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem üç kez tekrarlanmış olup, her seferinde üstteki sıvı faz ayrılarak aynı beherde biriktirildi. Son adımda, elde edilen nanopartiküller 5 mL distile su ile karıştırılarak homojen bir süspansiyon haline getirildi ve -80 °C'de dondurularak liyofilizasyon işlemine hazırlandı. Liyofilizatörde 24 saat boyunca kurutulan nanopartiküller, daha sonra kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

Bu yöntemle, RANP'ler başarılı bir şekilde sentezlendi. Deney sırasında, nanopartikül sentezini optimize etmek amacıyla RA, PLGA ve yüzey aktif madde

miktarlarında değişiklikler yapıldı. Ayrıca, kullanılan çözücüler de çeşitlendirilerek farklı çözücülerin sentez üzerindeki etkisi incelendi. Deneylerde, çözücü olarak etanol (EtOH), etil asetat (EtOAc) ve diklorometan (DCM) tercih edildi [129]. Yüzey aktif madde olarak ise bazı deneylerde Tween 80, bazı deneylerde polivinil alkol (PVA) kullanıldı [130]. Bu değişiklikler, nanopartikül oluşum sürecini optimize etmek ve farklı parametrelerin etkisini anlamak için gerçekleştirildi [131].

2.6.3 Rosmarinik Asit Taşıyan Nanopartiküllerin Reaksiyon Verimliliği, Yükleme Etkinliği ve Enkapsülasyon Etkinliği Değerlendirilmesi

Rosmarinik asit içeren nanopartiküllerin sentez etkinliğini analiz etmek amacıyla, etken madde yükleme kapasitesi, enkapsülasyon etkinliği ve reaksiyon verimliliği parametreleri hesaplanmıştır [132], [133]. Bu ölçümler, rosmarinik asidin 325,5 nm ve 332 nm dalga boylarında elde edilen UV absorbans değerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1 Nanopartikül Reaksiyon Verimliliği (RV) Hesaplanması

Katı formda üretilen nanopartiküllerin üretim verimliliği, başlangıçta kullanılan toplam polimer ve etken madde miktarına oranla, elde edilen nanopartikül miktarının gravimetrik olarak değerlendirilmesiyle hesaplanmıştır. Bu yaklaşım, nanopartikül sentez süreçlerinde kullanılan malzemelerin dönüşüm oranlarını değerlendirmek için tercih edilen standart bir yöntemdir [134]. Bu hesaplama, aşağıdaki 3.1’de verilen denklem temel alınarak gerçekleştirilmiştir [135].

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

3.2.3.2 Etken Madde Yükleme Veriminin (DL) Hesaplanması

Etken madde yüklenme verimi (Drug Loading, DL), nanopartiküllere yüklenen etken madde miktarının, toplam nanopartikül ağırlığına oranlanarak hesaplaması yapılmıştır. Bu hesaplama, 3.2’deki formüle uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Yüklenen etken madde miktarı, nanopartiküllerin içeriğinde bulunan etken maddelerin toplam ağırlığı olarak belirlenmektedir. Toplam nanopartikül miktarı ise, nanopartiküllerin etken maddeyle birlikte sentezlenen toplam ağırlığını ifade

etmektedir. DL, etken madde miktarının nanopartiküller üzerindeki yükleme kapasitesini gösterdiği için, biyomedikal uygulamalar için önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir [135]. Etken madde yüklenme verimi yüksek olan nanopartiküller, ilaç taşıma sistemlerinde daha etkili sonuçlar vermektedir[136].

$$DL(\%) = \frac{\text{Nanopartikül içine yüklenen rosmarinik asit (mg)}}{\text{Elde edilen nanopartikül miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.3.3 Enkapsülasyon Etkinliğinin (EE) Hesaplanması

Santrifüj işlemiyle yapılan üç yıkama sonrasında toplanan üst faz, UV spektrofotometrik olarak 325,5 nm dalga boyunda analiz edildi ve bu ölçümle üst fazda kalan rosmarinik asit (RA) miktarı belirlendi. Nanopartiküle yüklenen etken madde miktarı, başlangıçta kullanılan toplam etken madde miktarından yüklenmemiş madde miktarı çıkarılarak indirekt yöntemle hesaplandı [137]. Nanopartiküllere yüklenen RA miktarının, başlangıçta kullanılan toplam RA miktarına oranı kullanılarak enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır. Bu işlem, aşağıda verilen eşitlik (3.3) kullanılarak yapıldı.

$$EE(\%) = \frac{\text{Nanopartikül içine yüklenen rosmarinik asit (mg)}}{\text{Kullanılan rosmarinik asit miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.3)$$

2.6.4 Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Polimerik nanopartiküllerin büyüklükleri, boy dağılımı, kontrollü salımı, toksisitesi ve hedefleme özellikleri, ilaç yüklemesi, ilaç salımı ve nanopartiküllerin stabilitesini etkileyebilecek önemli faktörlerdir. Bu doğrultuda, üretilen nanopartiküllerin morfolojik özellikleri, Zeta Sizer cihazı ile yapılan boyut, dağılım ve zeta potansiyel analizleri kullanılarak incelendi. Ayrıca, optimize edilen nanopartiküllerin morfolojik yapısını detaylı bir şekilde incelemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve kimyasal bağ analizleri için FT-IR analizleri yapıldı.

3.2.4.1 Boyut ve Zeta Analizi

Sentetik olarak üretilen nanopartiküllerin boyutları, polidispersite indeksi (PDI) ve

zeta potansiyel değerleri Zetasizer Nano ZS cihazı (Malvern Instruments, UK) ile analiz edilmiştir [138]. Nanopartikül sentezinden sonra organik çözücülerin buharlaştırılmasının ardından, santrifüj işlemi öncesinde, 200 µL RANP örneği ayrılarak -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Analize alınacak örnekler, 30 kat sulandırılarak dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemiyle boyut ve PDI ölçümüne tabi tutulmuş, zeta potansiyel ölçümleri ise kapiler küvetler kullanılarak faz analiz ışık saçılması (ELS) metoduyla gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçümler 25 °C’de $\pm 0,1$ °C hassasiyetle ve üç tekrarlı olarak tamamlanmıştır.

3.2.4.2 FT-IR Analizi

Rosmarinik asit (RA), PLGA, ve RA yüklü PLGA nanopartiküllerinin fonksiyonel gruplarını belirlemek için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) kullanıldı [139]. FTIR, maddelerin kimyasal yapısını ve fonksiyonel gruplarını incelemek için kızılötesi ışık kullanarak yapılan bir analiz yöntemidir. Bu analizde, ATR (Attenuated Total Reflectance) modülü kullanıldı. ATR, özellikle numunenin yüzeyindeki molekülleri analiz eden bir tekniktir. Tüm analizler üç kez tekrarlı olarak yapıldı. Bu üç örneğin karşılaştırılabilir olarak incelenmesinin amacı, RA’nın PLGA ile etkileşimini ve nanopartiküller üzerinde yükleme verimliliğini gözlemlemektir. Böylece, polimerin nanopartikül yapısındaki etkisi ve yükleme süreçleri daha iyi anlaşılabilmıştir [140].

3.2.4.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Üretilen nanopartiküllerin yüzey morfolojisi, agregasyon durumu ve dağılım özelliklerini değerlendirmek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanıldı [141]. Nanopartiküllerin yüzey iletkenliğini artırmak için yüzeyleri altın tabaka ile kaplandı ve ardından yüksek vakum altında SEM analizi yapıldı. Bu analizde, 10.00 kV gerilimle ve 20.000x büyütme ile mikrograflar elde edildi. Mikrograf, mikroskop altında çekilen ve örneğin yapısal özelliklerini gösteren bir fotoğraf olarak tanımlanabilir. Elde edilen mikrograflar, nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin detaylı bir şekilde incelenmesine olanak tanıdı. Bu sayede nanopartiküllerin yüzey yapısı ve şekilleri hakkında kapsamlı bilgi edinildi.

2.6.5 Rosmarinik Asit Nanopartiküllerin *İn Vitro* Salımı

Liyofilize edilmiş RANP örneklerinden 3 mg alınarak, pH 7.4 olan 3 ml PBS

çözeltisi içinde çözüldü. 1:1 oranında hazırlanan RANP ve PBS karışımı, yatay çalkalayıcı da 37°C’de 200 rpm hızında çalkalanmaya bırakıldı. Salımlar, ilk 4 saat, 24 saat ve 48 saat olmak üzere kümülatif olarak hesaplandı. Belirlenen aralıklarla her örneğe 9000 rpm hızında, +4°C sıcaklıkta, 20 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulandı, süpernatanttan 1 ml alındı ve UV spektrofotometrede ölçüm yapıldı. Ardından, her örneğe 1 ml taze PBS eklenerek toplam hacim 3 ml’ye tamamlandı ve örnekler yeniden yatay çalkalayıcıya alındı. Bu süreç 30 gün boyunca devam etti [142]. Hesaplanan drug loading değerine göre 3 ml PBS içinde çözödürölen 3mg RANP içinde kaç mg RA olduğu hesaplandı. Üst fazların 325,5 nm dalga boyundaki UV absorbans değeri, RA için çıkarılan kalibrasyon eğrisindeki eğim değeri oranı, salınan total hacim miktarıyla çarpılarak nanopartikölden salınan ilaç miktarı hesaplandı. Daha sonra 3 mg RANP içinde bulunan RA miktarının ne kadarının salındığı 3.4’de verilen formöl ile hesaplandı.

$$\text{Salınan ilaç miktarı} = \frac{\text{Üst fazın UV absorbans değeri}}{\text{RA için hesaplanan eğim değeri}} \times \text{Total hacim (ml)} \quad (3.4)$$

Salınan ilaç miktarını (drug release) ve başlangıçta yüklö olan ilaç miktarını (drug loading) kullanarak salınan ilaç miktarının yüzdesi 3.5’ de verilen formöl ile hesaplanarak kümülatif toplam yapıldı.

$$\text{Salınan \% ilaç miktarı} = \frac{\text{Üst Salınan İlaç Miktarı (mg)}}{\text{Etken Madde Yöklenme Verim Değeri (DL)}} \times 100 \quad (3.5)$$

2.6.6 U87MG İnsan Glioblastoma Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü deneylerinde, U87MG insan glioblastoma hücre hattı (ATCC® HTB-14™) kullanıldı. U87MG hücreleri, epitel morfolojisine sahiptir ve yüzeye yapışarak (adherent) düzenli bir büyüme gösterir. Bu hücreler, birbirlerine sıkıca bağılı şekilde büyö. Hücreler, 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde inköbatörde kültöre edildi. U87MG insan glioblastoma hücre hattının temel özellikleri Tablo 3. 1’de özetlenmiştir.

Tablo 3. 1 U87MG insan glioblastoma hücre hattının temel özellikleri [143]

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

3.2.6.1 U87MG Hücre Hattının İlk Kültür Şartları ve Başlangıç Prosedürleri

Sıvı azot tankında (-196°C) kriyotüplerde muhafaza edilen U87MG hücreleri çıkarılarak, steril çalışma koşullarını sağlamak amacıyla laminar flow hücre kabineine alındı. Cam bir beherde hazırlanan distile su, su banyosu olarak kullanıldı ve hücrelerin çözünmesi sağlandı. Bu işlem öncesinde, +4°C saklanan besiyeri, oda sıcaklığına gelmesi için önceden çıkarıldı. Hücreler tamamen çözünmeden üzerine 1 ml besiyeri eklenip nazikçe pipetleme yapılarak çözünme tamamlandı. Daha sonra hücreler, 8 ml besiyeri içeren bir tüpe alındı ve 1500 rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası sıvı kısmı dökülerek çökelti halindeki hücreler 6 ml taze besiyeri ile karıştırıldı. Hücreler, yoğunluğuna göre uygun büyüklükteki T75 veya T25 flaska aktarıldı ve flasklar etiketlendi (hücre adı, pasaj numarası, tarih, isim). Flask yüzeyine tutunarak büyüyen hücreler yüzeyin %80'i dolana kadar 37°C'de, %5 CO₂ içeren nemli bir ortamda 2-3 gün boyunca inkübe edildi [144].

3.2.6.2 U87MG İnsan Glioblastoma Hücre Hattının Pasajlanma Prosedürü

U87MG hücre hattı, flask yüzeyindeki yoğunluk %70-80'e ulaşınca pasajlama işlemine tabi tutuldu. Bu işlem, hücrelerin aşırı çoğalması sonucu besiyerindeki besinlerin tükenmesini ve hücrelerin strese girmesini önlemek, aynı zamanda

sağlıklı büyüme ve çoğalma süreçlerini devam ettirebilmelerini sağlamak amacıyla yapıldı. Pasajlama işlemine başlamadan önce, kullanılacak besiyeri önceden çıkarıldı ve laminar hava akışı kabini 20 dakika UV ışığı ile sterilize edildi. İşlem, steril koşulların sağlandığı laminar hava akışı kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir [145].

Öncelikle hücrelerin eski besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 2-3 ml PBS ile yıkandı. Hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrılmasını sağlamak amacıyla, 1X Tripsin-EDTA'dan 1,5 ml eklendi ve sekiz çizme hareketiyle yüzeye eşit şekilde yayılması sağlandı [146]. Tripsinin aktivasyonunu sağlamak için hücreler, 37°C'lik CO₂'li inkübatör de 3-4 dakika süreyle inkübe edildi. Ancak, tripsinin daha uzun süre hücrelerle temas etmesi durumunda zarar verme riski olduğu göz önünde bulundurularak bu süre mümkün olduğunca kısa tutuldu. Hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı ışık mikroskobu altında kontrol edildi. Ayrışmanın tam sağlanmadığı durumlarda ise flaskı hafifçe yere vurdurarak ayrılma kolaylaştırıldı. Hücrelerin tamamen ayrılmasının ardından, tripsin aktivitesini inhibe etmek için kullanılan tripsin miktarının 3 katı kadar, yani 4,5 ml taze besiyeri eklendi. Serolojik pipet yardımıyla nazikçe pipetaj yapılarak hücreler toplandı. Elde edilen hücre süspansiyonu, 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine taze besiyeri eklendi. Hücreler tekrar pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. Homojen hale gelen hücre süspansiyonu, tam besiyeri içeren T75 flasklara aktarıldı. Flasklar, hücrelerin eşit dağılmasını sağlamak için sekiz çizme hareketiyle hafifçe hareket ettirildi. Sonrasında flasklar, 37°C'de %5'lik CO₂ içeren inkübatöre yerleştirildi ve flask yüzeyi tekrar %70-80 yoğunluğa ulaştığında pasaj işlemi aynı şekilde tekrarlandı.

3.2.6.3 U87MG İnsan Glioblastoma Hücre Hattının Sayım Prosedürü

Hücre sayımı, tripan mavisi ile yapılan boyama yöntemiyle gerçekleştirildi [147]. Bu işlem için öncelikle hücreler, pasaj protokolüne uygun şekilde hazırlandı. Daha sonra 50 µl hücre süspansiyonu ve 50 µl tripan mavisi, 1:1 oranında karıştırıldı. Elde edilen bu karışımdan 20 µl, dikkatlice pipet yardımıyla Thoma lamına aktarıldı ve ışık mikroskobu altında incelendi. Mikroskopik inceleme sırasında, parlak ve renksiz görünen hücrelerin canlı olduğu, tripan mavisini içine almış olan hücrelerin ise cansız olduğu gözlemlenmiştir.

Hücre sayımı, Thoma lamındaki 4 farklı bölgedeki 16 karedeki hücrelerin sayılarak ortalamasının alınmasıyla yapıldı. Alternatif olarak, tüm kareler de sayılabilir. Canlı hücre sayısı; elde edilen ortalama hücre sayısının, kullanılan dilüsyon faktörünün, toplam hacmin ve 10^4 faktörünün çarpılmasıyla hesaplandı. (Canlı hücre sayısı = Ortalama hücre sayısı $\times$ Dilüsyon faktörü (10^4) $\times$ Toplam hacim). Bu yöntem, hücrelerin canlılık oranını belirlemek ve deneysel işlemler için gerekli hücre yoğunluğunu sağlamak amacıyla kullanıldı.

3.2.6.4 U87MG İnsan Glioblastoma Hücre Hattının Dondurulması

U87MG hücre hattının dondurulması amacıyla kriyotüpler önden etiketlendi ve kontaminasyonu önlemek için 20 dakika boyunca UV ışınına maruz bırakıldı. Hücrelerin dondurulması için %90 FBS ve %10 DMSO içeren bir dondurma solüsyonu hazırlandı. Yüzde 80 konfluent olan bir T75 flastaki hücrelerin üzerindeki eski besiyeri uzaklaştırıldı, ardından 2 mL PBS ile yıkama gerçekleştirildi. Sonrasında tripsinden 1,5 mL alınarak flaska eklendi ve hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Tripsinin etkisini durdurmak amacıyla 4,5 mL taze besiyeri eklendi ve hücreler toplandı. Santrifüj edilerek çöktürülen hücre peleti üzerine hazırlanan dondurma solüsyonu eklenerek homojenize edildi. Hücreler, yaklaşık 10^6 hücre/mL olacak şekilde kriyotüplere aktarıldı. Kriyotüp kapakları parafilm ile kapatılarak sızdırmazlık sağlandı. Kriyotüpler, kademeli soğutma işlemi için özel bir soğutma kabına dik bir şekilde yerleştirildi ve bir gece boyunca -80°C 'de bekletildi. Daha sonra, dondurulan hücreler uzun süreli saklama için -196°C 'deki sıvı azot tankına aktarıldı.

2.6.7 Rosmarinik Asit İçeren Nanopartiküllerin *İn Vitro* Biyolojik Etkilerinin İncelenmesi

3.2.7.1 MTT Testi

Serbest RA ve RANP'nin U87MG hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini ve IC₅₀ değerlerini belirlemek amacıyla MTT yöntemi kullanıldı. MTT (Metil Tiazol Tetrazolyum) hücre canlılığı testi, hücrelerin metabolik aktivitelerini değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir [148]. Bu testte, mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından indirgenen MTT, metabolik olarak aktif ve canlı hücrelerde çözünmeyen mor renkli formazan kristalleri oluşturur. Oluşan kristaller, çözücü olarak kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözülerek 570 nm dalga boyunda ELİSA ile ölçülür ve hücre canlılığı kantitatif olarak değerlendirilir [149].

Deneyde, U87MG hücreleri 96 kuyulu mikropalaklara, her bir kuyucuğa 10⁵ hücre olacak şekilde ekilerek 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Ardından, kontrol gruplarına taze besiyeri, deney gruplarına ise farklı konsantrasyonlarda RA ve RANP uygulandı. Mikropalaklar 48 saat inkübasyona bırakılarak hücrelerde meydana gelen sitopatolojik değişiklikler mikroskop ile incelendi. İnkübasyon süresi sonunda, her bir kuyudaki besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine önceden hazırlanan %0,06 konsantrasyondaki MTT çözeltisinden 50 µL karanlık ortamda eklendi. Hücreler, MTT çözeltisi ile 37 °C'de 3 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda, kuyulardaki MTT çözeltisi uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklenerek formazan kristalleri çözdürüldü. Çözülen formazan kristallerinin absorbansı ELISA cihazı ile 570 nm dalga boyunda ölçüldü ve hücre canlılık oranları hesaplanarak 48.saatteki IC₅₀ değerleri belirlendi.

3.2.7.2 Yara İyileşmesi Testi

MTT testinden elde edilen 48.saat IC₅₀ dozları, RA ve RANP için üç tekrarlı olacak şekilde hesaplandı. Kontrol grubu için üç kuyu da dahil olmak üzere, toplam dokuz kuyuya U87MG glioblastoma hücreleri, 24 bölmeli kültür plakalarına, her kuyucuğa 10⁵ hücre uygun koşullarda ekimi yapıldı ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

U87MG hücreleri mikropalakalara tutunup konfluens seviyesine ulaştığında, her bir kuyucuğa 200 µL'lik pipet ucu kullanılarak yukarıdan aşağıya düz bir çizgi oluşturuldu. Çizgiler, mikroskop altında kontrol edildikten sonra besi yeri çizilen çizginin bitiminden dikkatlice çekilerek uzaklaştırıldı. Kontrol gruplarına, mikropalkanın duvarından yavaşça 1 mL taze besiyeri verildi. Serbest RA ve RANP'nin IC₅₀ dozları, 48. saatte belirlenen dozlarına göre her gruba eklendi. 0, 4, 8, 12, 24 ve 48. saatlerde, ışık mikroskobu ile her bir alanın fotoğrafları çekildi. ImageJ yazılımı kullanılarak hücre sayımı ve hücreler arasındaki mesafeler üç kez tekrarlanarak analiz edildi [150].

3.2.7.3 Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücreleri Üzerinde Apoptozis Tespiti İçin DAPI Boyama

DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole), DNA'ya özgü bağlanma özelliği gösteren floresan bir boyadır ve özellikle çift zincirli DNA'nın küçük oluklarına bağlanarak mavi floresan ışık yayar [151]. DAPI boyası, hücre çekirdeklerinin net bir şekilde görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem, özellikle apoptoz sırasında DNA'nın parçalanması ve çekirdek yapısındaki belirgin değişikliklerin gözlemlenmesinde önemlidir. Apoptoz sürecinde, DNA yoğunlaşması, kromatin kırılmaları ve çekirdek fragmentasyonu gibi morfolojik değişiklikler ortaya çıkmaktadır. DAPI boyası ile bu değişiklikler kolaylıkla gözlemlenmekte ve apoptotik hücreler sağlıklı hücrelerden ayırt edilebilmektedir [152].

Boyama işlemi için, yara onarımına yönelik olarak 24-well plakaya ekilen hücrelerin 48. saatteki mikroskobik görüntüleri alındıktan sonra üzerlerindeki besiyeri çıkarıldı. Hücreler, 500 µL PBS ile yıkandı ve her kuyuya 500 µL %100 metanol eklenerek 10 dakika süreyle sabitlendi. Metanol, hücre zarını geçirgenleştirerek hücre içi bileşenlerin korunmasını sağlar ve hücrelerin morfolojik yapılarının bozulmasını engeller. Sabitleme işlemi sonrasında hücreler, iki kez PBS ile yıkandı. Ardından hücreler 250 µL DAPI çözeltisi ile inkübe edilerek yaklaşık 10 dakika bekletildi. DAPI ile muamele edilen hücreler, fazla boyayı uzaklaştırmak için PBS ile 3 kez yıkandı ve 4 saat kurutulmaya bırakıldı. Bu işlem sonucunda hücreler, floresan mikroskop altında mavi renkte görülen çekirdek yapıları analiz edildi. Apoptotik hücreler, yoğunlaşmış kromatin yapısı, parçalanmış DNA ve çekirdek deformasyonları gibi tipik özellikleri 20x ve 40x

büyütme ile incelenmiştir. Görüntüler, ImageJ yazılımı ile analiz edilmiştir.

3.2.7.4 Total RNA İzolasyonu

U87MG hücreleri, Kontrol, RA ve RANP grupları için üç adet T25 flaska, her birine 10^6 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin tutunması için 24 saat beklenildi. RA ve RANP için 48. saatte belirlenen IC_{50} dozları T25 flasklara eklenerek 48 saatlik bir inkübasyon süreci tamamlandı. İnkübasyon işleminin ardından, Zymo Research Direct-zol RNA MiniPrep kiti kullanılarak RNA izolasyonu üreticinin önerdiği protokol doğrultusunda gerçekleştirildi [153].

Öncelikle, flasklardaki besi yeri uzaklaştırıldı ve hücreler 2 mL PBS ile nazikçe yıkandı. Ardından flasklara 2,5 mL Trizol eklendi ve bu karışım karanlık bir ortamda 2 dakika bekletildi. Hücreler, steril bir cell scraper ile kazındı ve 2 mL'lik serolojik pipet ile toplanarak, etiketlenen üç ayrı 15 mL'lik falkon tüpe alındı. Sonrasında, her bir falcon tüpe 950 μ L kloroform eklenerek karışım dikkatlice karıştırıldı. Bu karışım, 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine bölündü ve 2 dakika bekletildikten sonra 4°C'de 15,000 rpm hızında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üç katmanlı faz ayrışması gözlemlendi. Total RNA'nın bulunduğu süpernatant kısmı dikkatlice yeni mikrosantrifüj tüplerine alındı. Süpernatant miktarı pipetle ölçülüp, eşit miktarda 1:1 oranında etanol eklenerek pipetaj yapıldı. Karışım, etiketlenen üç ayrı spin kolonuna alındı ve 14,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Elde edilen karışım 700 μ L'den fazla ise, tek seferde spin kolona alınamayacağından işlem tekrarlandı. Santrifüj sonrası, alt tüpteki atık materyaller uzaklaştırıldı. Ardından, kolonlar 400 μ L RNA Wash Buffer ile yıkandı ve 14,000 rpm hızında 1 dakika boyunca santrifüj edildi filtreden alt toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı. Yıkama işlemini takiben kolonlara 5 μ L DNaz I ve 75 μ L DNA Digestion Buffer karışımı eklendi. Kolonlar, oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilerek DNA temizliği tamamlandı. Son işlem adımında, spin kolonlara 400 μ L Direct-zol RNA PreWash çözeltisi eklendi ve 14,000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Bu adım tekrar edilerek, toplama tüpünde biriken atık sıvı tamamen uzaklaştırıldı. Ardından, kolonlara 700 μ L RNA Wash Buffer eklendi ve 2 dakika boyunca 14,000 rpm'de santrifüjlendi ve toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte çöpe atıldı. Kolonlar yeni RNaz-free tüplere geçirildi. Spin kolonunun ortasına 22 μ L DNaz ve RNaz içermeyen saf su ilave edildi ve 14,000 rpm hızında 1 dakika santrifüj edilerek spin

kolondaki RNA'nın alt tüpe geçmesi sağlandı. Son aşamada, elde edilen RNA örnekleri buz barının üzerindeki RNaz-free tüplerine alındı ve +4°C'de buz üzerinde cDNA sentezi yapmak üzere kaldırıldı.

3.2.7.5 RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İzole edilen RNA'nın kalitesi ve miktarı, Thermo Scientific'e ait Nanodrop UV-Vis Spektrofotometre kullanılarak belirlendi. Ölçüm yapılmadan önce, cihazın probu DNaz/RNaz içermeyen (DNaz/RNaz-free) suyla temizlendi ve ardından 1 mikrolitre temiz su ile "blank" ölçümü gerçekleştirildi. Sonrasında, RNA örneğinden 1 mikrolitre alınarak, sırasıyla 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbans değerleri kaydedildi.

Nükleik asitlerin DNA/RNA'nın saflığı, genellikle A260/A280 oranı ile değerlendirilir. RNA, 260 nm dalga boyunda UV ışığını emdiği için bu dalga boyundaki absorbans değeri, RNA'nın konsantrasyonunu belirler. 280 nm'deki absorbans ise genellikle proteinlerin ışık emilimiyle ilişkilidir. Saf bir RNA örneği için ideal A260/A280 oranı yaklaşık 1,8 olmalıdır. Bu değer, RNA'nın büyük ölçüde saf olduğunu ve protein gibi kontaminantların bulunmadığını gösterir. A260/A280 oranının 1,6'nın altına düşmesi, RNA örneğinde protein veya diğer organik kirleticilerin bulunduğunu gösterir. Bu düşük oran, genellikle RNA izolasyonu sırasında proteinlerin tam olarak uzaklaştırılmadığını veya RNA örneğiyle birlikte fazla miktarda protein veya DNA'nın kaldığını işaret eder. Öte yandan, A260/A280 oranının 2,0'nin üzerinde olması, RNA örneğinde fenolik bileşikler veya organik çözücüler gibi kontaminasyonların olduğunu gösterebilir. Fenolik bileşikler, RNA'nın izolasyon sürecinde kullanılan bazı kimyasallar (örneğin, triklor asetik asit veya kloroform) ile kalabilir ve bu da 280 nm'deki absorbansı artırır [154].

Saflık analizinde ayrıca A260/230 oranı da dikkate alınır. Bu oran, nükleik asitlerin saflığını etkileyen fenol ya da diğer kimyasal kontaminasyonların değerlendirilmesinde kullanılır ve ideal olarak 2,0-2,2 aralığında olmalıdır. Hem A260/280 hem de A260/230 oranları, RNA'nın saflık durumunu doğru bir şekilde analiz etmek ve güvenilir sonuçlar elde etmek için kritik parametrelerdir.

3.2.7.6 cDNA Sentezi

İzole edilen total RNA'dan cDNA sentezi işlemi, SensiFAST cDNA Sentez Kiti kullanılarak yapılmıştır [155]. Bu işlem için hazırlanan karışımın içerik detayları Tablo 3. 2'de sunulmaktadır.

Tablo 3. 2 cDNA sentezi bileşenleri

Bileşen	Hacim
Total RNA	15 µl
5x TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
TOPLAM	20 µl

Kontrol, serbest RA ve RANP gruplarından izole edilen total RNA'lardan 15 µl alınarak, buz blok üzerinde bekletilen 3 ayrı PCR tüpüne transfer edildi. SensiFAST cDNA Sentez Kiti'nde bulunan 5x TransAmp Buffer ve Reverse Transkriptaz enzimlerinin buzlu çözüldükten sonra, kısa bir süre spin edilerek homojen hale getirildi. Her RNA numunesine 4 µl 5x TransAmp tampon ve 1 µl Reverse Transkriptaz enzimi eklendi, pipetleme işlemiyle iyice karıştırıldıktan sonra tekrar spin edildi. Oluşturulan karışım, cDNA sentezi işlemi için optimize edilmiş koşullarda PCR cihazında çalıştırılmıştır. PCR cihazı, Tablo 3. 4'te tanımlanan işlem parametrelerine göre programlanmıştır. Sentezlenen cDNA örnekleri, daha sonra gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) analizlerinde kullanılmak üzere -20°C'de saklanarak korunmuştur.

Tablo 3. 3 cDNA sentez reaksiyon koşulları

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

3.2.7.7 Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (qRT-PCR) Prosedürü

RA ve RANP'nin U87MG insan glioblastoma hücre hattındaki IC₅₀ konsantrasyonlarına karşılık gelen dozlarda uygulanmasını takiben, 48 saatlik inkübasyon süresini takiben apoptotik süreçle ilişkili genlerin ekspresyon düzeyleri detaylı bir şekilde incelenmiştir. Bu inceleme sırasında, hücre içi (intrinsik) apoptotik yolda görev alan kaspaz-3, kaspaz-9 ve sitokrom-c, genlerinin yanı sıra, dışsal (ekstrinsik) apoptotik yolda yer alan kaspaz-8'in ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir [156]. Ayrıca, hücre ölümünü teşvik eden proapoptotik Bax geni ile hücreyi korumaya çalışan anti-apoptotik Bcl-2 geninin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Bax ve Bcl-2 genleri arasındaki denge (Bax/Bcl-2 oranı), apoptotik sürecin aktif olup olmadığını belirlemede kritik bir rol oynar [157]. Bu genlerin ekspresyon seviyeleri, referans gen olarak β -aktin (house-keeping gen) ekspresyonları kullanılarak normalize edilmiş ve gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) yöntemiyle hassas bir şekilde karşılaştırmalı olarak ölçülmüştür [158].

Hedef genlere özgü primerler, Sentegen firması tarafından özel olarak sentezlendi ve üretici firmanın protokolüne uygun şekilde DNaz/RNaz içermeyen su (DNaz/RNaz-free) kullanılarak çözündürüldü. Bu primerler, 10 μ M konsantrasyonunda stok çözeltiler olarak hazırlandı. Analiz kapsamında kullanılan genler, Tablo 3. 6'da belirtildiği gibidir. Ayrıca, qRT-PCR analizi öncesinde elde edilen cDNA örnekleri, doğru ölçüm sonuçları elde etmek için 1:4 oranında seyreltildi. Reaksiyon karışımları, SYBR Green boyası, ileri ve geri primerler (forward ve reverse), cDNA örnekleri ve saflaştırılmış dH₂O ile hazırlandı. Her gen için gerekli karışım miktarları detaylı olarak Tablo 3. 4'te verildiği gibidir. Buz bloğu üzerindeki 96 kuyuluk PCR plakasında her bir örnek 3 tekrarlı olacak şekilde yerleştirildi; kalan boş kuyular ise negatif kontrol olarak ayrıldı. Ekspresyon analizi yapılacak her gen için master mix ayrı bir tüpte karıştırıldı ve her bir kuyunun içine 18 μ l master mix eklendi. Daha sonra, her bir kuyuya 2 μ l cDNA örneği ilave edildi. Amplifikasyon işlemi, 95°C'de 2 dakika süren başlangıç denatürasyonu ile başlamış, ardından 95°C'de 5 saniye (denatürasyon), 63°C'de 10 saniye (primer bağlanma) ve 72°C'de 15 saniye (uzama) olmak üzere toplamda 40 döngü şeklinde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan termal döngü koşulları ve reaksiyon detayları Tablo 3. 5'te verildiği gibidir.

Tablo 3. 4 qRT-PCR için hazırlanan reaksiyon karışımları ve kullanım miktarları

Kimyasal Adı	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu	Bir Reaksiyon için Kullanılan Miktar
SensiFAST SYBR Lo-Rox	2x	2x	10 µl
Forward Primer	100 µM	10 µM	0,8 µl
Reverse Primer	100 µM	10 µM	0,8 µl
cDNA	-	-	2 µl
dH2O	-	-	6,4 µl

Tablo 3. 5 qRT-PCR analizinde uygulanan reaksiyon koşulları

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

Tablo 3. 6 qRT-PCR analizinde kullanılan hedef genlerin primer dizilimleri, ürün uzunlukları ve Tm değerleri

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

3.2.7.7 Deneysel Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Deneylerin her birine ait ölçüm sonuçları, üç kez tekrarlanan deneylerden elde edilmiştir. Bu sonuçlar kullanılarak ortalama değerler hesaplanmış ve verilerin dağılımını değerlendirmek için $\pm$ SD (standart sapma) değerleri belirlenmiştir.

RA ve RANP gruplarına ait grafikler, deney verilerinin görselleştirilmesi ve analiz edilmesi amacıyla GraphPad Prism 8.4.3 istatistik yazılımı kullanılarak hazırlandı. Kontrol ve deney grupları arasındaki farklılıkların istatistiksel anlamlılığı da aynı yazılım aracılığıyla değerlendirilmiş olup, $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak

anlamli kabul edilmiştir. Bu değerlendirmede, $p < 0,05$ değeri, gruplar arasındaki farkların rastgele (tesadüfi) olma olasılığının %5'ten düşük olduğu anlamına gelir ve bu tür bir fark istatistiksel olarak anlamli kabul edilir [159]. Yani, elde edilen farkların, yalnızca tesadüfi nedenlerden kaynaklanmadığı, aksine deneysel müdahalenin bir sonucu olduğu anlaşılır [159]. Bu anlamlılık testi, araştırma sonuçlarının güvenilirliğini ve bilimsel geçerliliğini sağlamak için temel bir ölçüt olarak kullanılmıştır.



4.1 Rosmarinik Asidin UV-Spektral Davranışı ve Kalibrasyon Eğrilerinin Değerlendirilmesi

Rosmarinik asit çözeltisi, hem etanol (EtOH) hem de etil asetat (EtOAc) kullanılarak hazırlandı. 1 mg RA, 10 ml etil asetatta çözündürülerek 0,1 mg/ml konsantrasyonunda bir stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden, 0,01 mg/ml ile 0,009 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda seyreltme yapılarak yeni çözeltiler hazırlandı ve bu çözeltilerin UV spektrofotometrede absorbans değerleri ölçüldü. Sonuç olarak, rosmarinik asidin maksimum absorbans dalga boyunun etil asetat ortamında 325,5 nm olduğu saptandı.

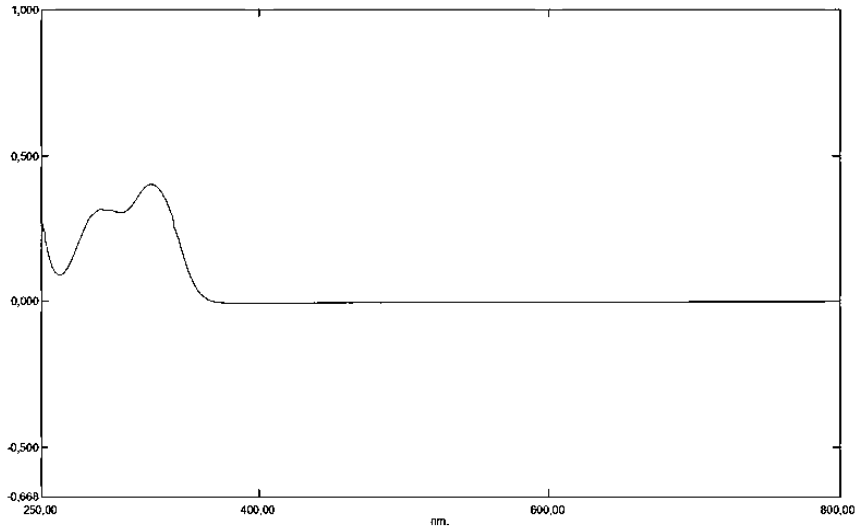
Etanol ortamında yapılan ölçümler için 1 mg rosmarinik asit, 10 ml etanol içinde çözülerek bir ana stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti, 0,1 mg/ml ile 0,009 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda seyreltildi ve hazırlanan çözeltiler UV-Vis cihazında analiz edildi. Analizler sonucunda, etanol ortamındaki maksimum absorbans dalga boyunun 332,5 nm olduğu belirlendi.

Elde edilen veriler kullanılarak farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler için kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Farklı konsantrasyonlarda UV-Vis ölçümleri, fenolik bileşiklerin nicel analizinde yaygın bir yöntemdir. Etil asetat ve etanol gibi çözücüler, fenolik bileşiklerin çözünürlüğü ve spektral özelliklerini etkiler [160]. Maksimum absorbans dalga boylarının çözücüye bağlı olarak değiştiği literatürde rapor edilmiştir [161], [162]. Rosmarinik asit gibi fenolik bileşikler, 320-340 nm aralığında maksimum absorbans dalga boyu gösterebilir. Bu, konjugasyon yapılarının ve aromatik halkaların karakteristik bir özelliğidir [161].

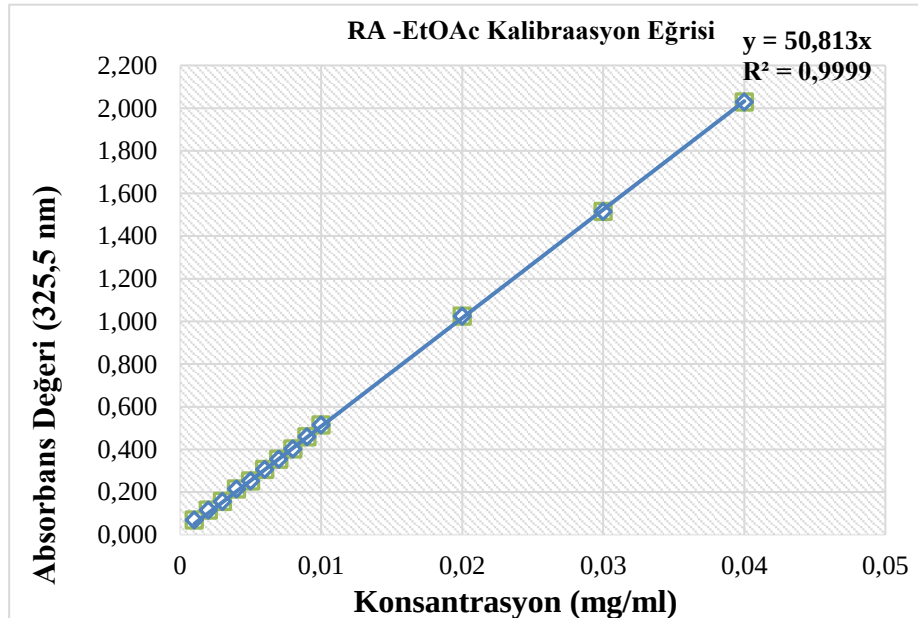
Etil asetatta yapılan analizlerde maksimum absorbansın 325,5 nm dalga boyunda

olduğu görüldü ve bu grafiğin detaylı gösterimi Şekil 4.1’de verildi. Etil asetat ortamındaki ölçümlere ait kalibrasyon grafiği ise Şekil 4.2’de yer almaktadır.

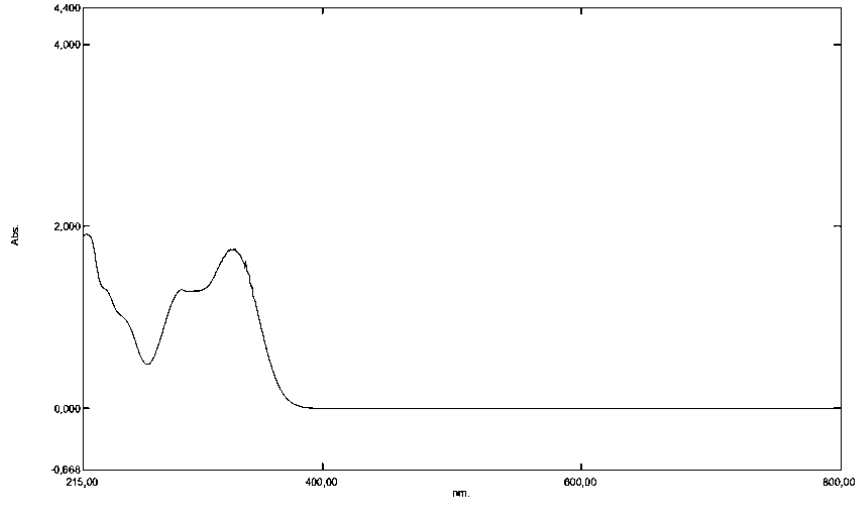
Rosmarinik asidin etanol çözeltisinde 332,5 nm dalga boyunda verdiği absorbans sonuçları Şekil 4.3’te sunulmuş, farklı konsantrasyonlara dayalı olarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi ise Şekil 4.4’te verilmiştir.



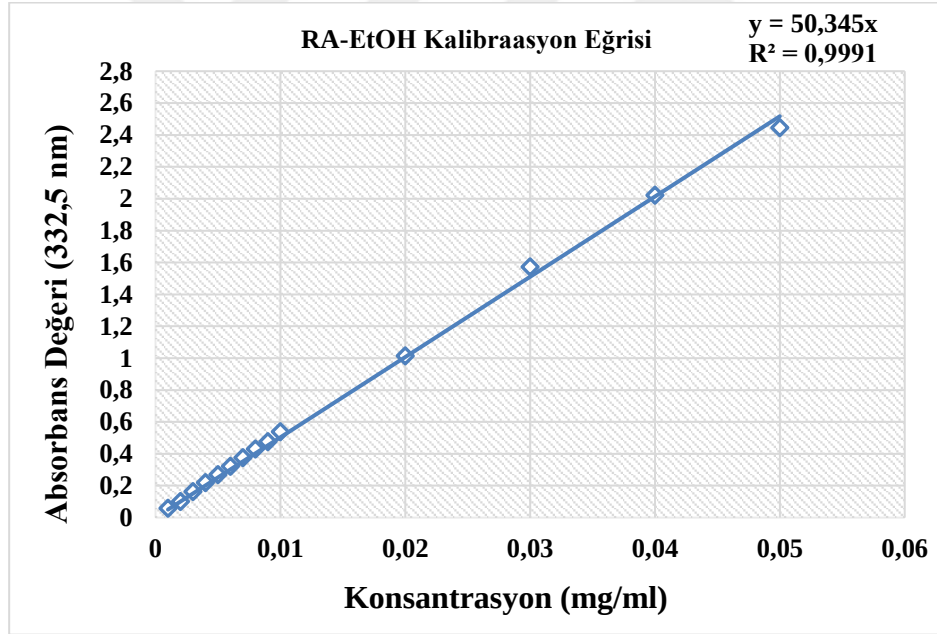
Şekil 4. 1 Rosmarinik asitin etil asetata karşı UV-Vis spektrumu



Şekil 4. 2 Rosmarinik asitin etil asetata karşı hazırlanmış kalibrasyon eğrisi



Şekil 4. 3 Rosmarinik asitin etil alkole karşı UV-Vis spektrumu



Şekil 4. 4 Rosmarinik asitin etil alkole karşı hazırlanmış kalibrasyon eğrisi

4.2 Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin Sentez Çalışması

Bu tez çalışmasında, rosmarinik asit (RA) etken maddesinin nanopartikül formülasyonu, tekli emülsiyon (o/w) çözücü uçurma yöntemiyle hazırlandı [128]. Bu çalışmada, rosmarinik asit (RA) yüklü PLGA nanopartiküllerinin üretimi için sekiz farklı sentez gerçekleştirildi. RA miktarı ve PLGA miktarı değiştirilen bu sentezlerde, ayrıca farklı stabilizatörler kullanılarak nanopartikül boyutu, stabilite ve homojenlik özellikleri optimize edildi. Sentezler arasında kullanılan stabilizatörler, sonikasyon parametreleri ve PLGA ile RA oranları farklılık göstermektedir [132].

İlk dört sentezde, nanopartiküllerin stabilizasyonu için iç fazda %3'lük 4 ml PVA ve dış fazda %0,1'lik 35 ml PVA kullanıldı. Bu sentezlerde, PLGA miktarı ve RA yüklemesi farklı oranlarda yapıldı ve sonikasyon işlemi 80 amper gücünde 90 saniye süreyle gerçekleştirildi. PVA kullanımı, emülsiyon stabilitesini sağlamada etkili oldu ve bu sentezlerde homojen nanopartiküller elde edildi [163]. Bu dört sentezde nanopartiküllerin boyutları, RA miktarına ve PLGA oranına göre 170 nm ile 376 nm arasında ve zeta potansiyel değerleri -4,97 mV ile -25,1 mV arasında ölçüldü.

Sonraki dört sentezde, stabilizatör olarak Tween 80 kullanıldı. Literatürde Jessica García-Melero ve arkadaşlarının yaptığı çalışma: 'Düşük Enerjili Nano-Emülsiyon Şablonlama ile Hazırlanan Rosmarinik Asit Yüklü Polimerik Nanopartiküller' baz alınarak optimizasyon parametreleri değiştirildi [128]. Bu sentezlerde, PVA yerine iç fazda %3'lük 4 ml Tween 80 ve dış fazda %0,1'lik 45 ml Tween 80 eklendi. Bu stabilizatör, emülsiyonun stabilitesini artırarak daha küçük nanopartiküllerin elde edilmesine katkı sağladı. Bu sentezlerde de PLGA miktarı ve RA miktarı farklı oranlarda değiştirildi ve sonikasyon işlemi 50 amper gücünde 90 saniye süreyle yapıldı. Tween 80 kullanımı, özellikle nanopartikül boyutunu küçülttü ve homojenlik sağladı. Tablo 4.1 de görülen 6. sentezde, RA miktarının 3 mg ve PLGA miktarının 75 mg olduğu formülasyon (RANP-6), 93,42 nm ile en küçük partikül boyutu ve yüksek stabiliteye sahip partiküldür. RANP-6 ayrıca yüksek enkapsülasyon etkinliği ve reaksiyon verimi açısından da başarılı sonuçlar gösterdi. Bu sebeplerden ötürü bu tez çalışmasında RANP-6'nın kullanılmasına karar verildi.

Tablo 4. 1 Nanopartikül optimizasyon parametreleri

NP	Bileşenler		PVA Miktarı		RA Çözücü		PLGA Çözücü		TWEEN 80 Miktarı		Sonikasyon
	RA (mg)	PLGA (mg)	İç Faz (ml-% 3)	Dış faz (ml-%0,1)	Etil alkol (ml)	Etil Asetat (ml)	DCM (ml)	Etil Asetat (ml)	İç Faz (ml-%)	Dış faz (ml-%)	
NP-1	3	75	4 ml	35 ml	0,5 ml	-	1,5 ml	-	-	-	1,5 dk %80 güç
NP-2	3	75	4 ml	35 ml	0,5 ml	-	1,5 ml	-	-	-	1,5 dk %80 güç
NP-3	3	75	4 ml	35 ml	0,5 ml	-	-	1,5 ml	-	-	1,5 dk %80 güç X2
NP-4	3	75	4ml	35 ml	-	0,5 ml	-	1,5 ml	-	-	1,5 dk %80 güçX2
NP-5	3	75	4 ml	35 ml	0,5 ml	-	-	1,5 ml	-	-	1,5 dk %80 güç
NP-6	3	75	-	-	-	0,5 ml +300 mcl %3tween80)	-	1,5 ml	4 ml (%3)	45 ml (%0,1)	1,5 dk %50 güç
NP-7	1	50	-	-	-	0,3 ml +200 mcl %3tween80)	-	1,5 ml	4 ml (%3)	45 ml (%0,1)	1,5 dk %50 güç
NP-8	1	50	-	-	-	0,3 ml +200 mcl %3tween80)	-	1,5 ml	4 ml (%3)	45 ml (%0,1)	1,5 dk %50 güç

4.3 RANP’lerin Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Etken Madde Yükleme Kapasitesi

Sekiz farklı sentezle üretilen nanopartiküllerin fiziko-kimyasal karakterizasyon sonuçları Tablo 4. 2’de görölmektedir. Yapılan analizler sonucunda, en iyi özelliklere sahip sentezin RANP-6 sentezine ait olduğu gözlemlenmiştir.

RANP-6’daki %33 olan yüksek enkapsülasyon etkinliği (EE), etkin maddenin büyük bir kısmının partiküllere yüklendiğini gösterir. Etken madde yükleme kapasitesi (DL) değeri %1,83 olan RANP-6’nın orta seviyede yükleme kapasitesini ve %69 olan yüksek reaksiyon verimi (RV), sürecin verimliliğini ve ileri çalışmalarda kullanılabilircek yeterli partikülün olduğunu gösterir. Ayrıca RANP-6’nın 93,42 nm olan partikül boyutu ve homojen bir dağılımı olduğunu gösteren 0,1-0,3 arasında olan PDI, yüksek stabiliteyi temsil eden -42,1 mV Zeta Potansiyeli, RANP-6’nın hem biyolojik etkinlik hem de fiziksel stabilite açısından dengeli bir formülasyon olduğunu göstermektedir.

RANP-6, glioblastoma tedavisinde KBB’den kaynaklı sorunların önüne geçmek için ideal boyut aralığındadır. Ayrıca yüksek enkapsülasyon etkinliği olması ve yüksek reaksiyon verimi sebebiyle glioblastoma hücreleri üzerinde anti-kanser etkinliğini gösterebilmek adına yapılacak deneyler için yeterli hacimde partikül elde edilmiştir. Tüm bu sebeplerden ötürü RANP-6’nın dengeli bir formülasyon olduğuna karar verilmiştir. Sonuç olarak, U87MG insan glioblastoma hücre hattı üzerinde RANP’lerin sitotoksik etkisinin belirlenmesi adına RANP-6’nın kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4. 2 Sentezlenen nanopartiküllerin fiziko-kimyasal özelliklerine ilişkin karakterizasyon parametreleri

NP	RA Miktarı (mg)	Üst faz miktarı (ml)	Enkaps üle RA Miktarı (mg)	Non- enkaps üle RA Miktarı (mg)	Enkaps ülasyon Etkinliği (%) (EE)	Boyut Z-ave (nm)	Çoklu Dağılım İndeksi (PDI)	Zeta Potansi yeli (mV)	Reaksiy on Verimi (%) (RV)	Etkin madde yüklen me verimi (DL)
NP-1	3	140 ml	0,7	2,299	23,33%	176,6	0,242	-22,7	41,15	2,18
NP-2	3	150ml	0,184	2,815	6,13%	170,8	0,229	-25,1	28,84	0,82
NP-3	3	135 ml	0,318	2,681	11%	376,2	0,579	-4,97	37,17	1,10
NP-4	3	140 ml	0,666	2,333	22,20%	1897	0,89	-13,5	61,025	1,40
NP-5	3	110 ml	1,4	1,599	46,66%	298,9	0,68	-10,2	17,43	10,29
NP-6	3	120 ml	0,9926	2,00736	33%	93,42	0,132	-42,1	69,00%	1,83
NP-7	1	152 ml	0,617	0,382	62%	50,8	0,384	-26,7	43,92	2,75
NP-8	1	115 ml	0,6085	0,3915	61%	32,13	0,383	-29,1	2,35%	50,71

4.3.1 Nanopartikül Reaksiyon Verimliliği (RV) Hesaplanması

Tablo 4. 2'de sunulan verilere göre, 3 mg etken madde (RA) ve 75 mg PLGA kullanılarak sentezlenen NP-6 nanopartikülünün hücre kültürü çalışmaları gibi biyolojik uygulamalar için uygun özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nanopartikül, hücre üzerindeki biyolojik etkileşimlerini test etmek amacıyla ideal boyut ve zeta potansiyeline sahip olup, reaksiyon verimi %69 olarak hesaplanmıştır. Bu özellikler, NP-6'nın hücre alım ve biyoyumluluk gibi faktörler açısından etkili bir aday olduğunu göstermektedir. Nanopartiküllerin reaksiyon verimleri, 3.1 eşitliği kullanılarak ve Tablo 4. 1'de belirtilen verilere dayanarak hesaplanmıştır. Reaksiyon verimi, polimer ve etken madde kombinasyonunun nanopartikül oluşturmadaki başarısını ifade etmektedir [164].

Tablo 4. 2'de yer alan verilere göre, reaksiyon verimi kullanılan etken madde ve PLGA miktarına göre değişiklik göstermektedir. Örneğin, 3 mg RA ve 75 mg PLGA ile hazırlanan NP-6'nın reaksiyon verimi %69 olarak belirlenirken, 50 mg PLGA kullanılarak üretilen NP-8'in reaksiyon verimi %2,35 olarak hesaplanmıştır. Bu durum, PLGA miktarının artırılmasının reaksiyon verimini önemli ölçüde artırabileceğini ortaya koymaktadır. Örneğin, NP-6 örneğinde elde edilen yüksek reaksiyon verimi (%69,00), iyi bir karıştırma, stabil çözücü seçimi ve uygun sonikasyon koşulları gibi faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir.

Buna karşın, NP-8 örneğinde düşük reaksiyon verimi (%2,35), zayıf emülsiyon oluşumu veya yetersiz çözücü buharlaşması gibi olumsuz faktörlerden kaynaklanabilir. Bu bağlamda, polimer miktarı (PLGA), çözücü seçimi (örneğin, DCM ve etil asetat karışımı) ve sonikasyon koşulları (güç ve süre) reaksiyon verimi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Elde edilen bu bulgular, literatürde de PLGA miktarının reaksiyon verimini anlamlı şekilde etkilediğini gösteren çalışmalarla uyumludur [165].

4.3.2 Etken Madde Yüklenme Verimi (Drug Loading, DL)

Tablo 4. 2'de yer alan verilere göre, NP-8 (%50,71) ve NP-5 (%10,29) en yüksek DL değerlerine sahip partiküllerdir. Yüksek DL değerleri, partiküllerin daha fazla etkin madde yükleyebildiğini ve dolayısıyla terapötik etkilerinin artabileceğini gösterir [166]. NP-8, boyutunun çok küçük olması (32,13 nm) ve yüksek DL

oranıyla öne çıkar. Ancak, reaksiyon veriminin (%2,35) düşük olması, bu partikülün üretim sürecinde fazla kayıplar yaşandığını ve pratikliğini sınırlayabileceğini gösteriyor. Benzer şekilde, NP-5, yüksek DL (%10,29) ve EE (%46,66) oranlarıyla dikkat çeker; ancak büyük boyutu (298,9 nm) ve yüksek PDI değeri (0,68), uygulamalarda sınırlayıcı olabilir.

Buna karşılık, NP-6, DL açısından orta bir değere (%1,83) sahip olsa da, stabilitesi (yüksek zeta potansiyeli, -42,1 mV), homojen partikül dağılımı (PDI: 0,132), ve ideal boyutuyla (93,42 nm) genel olarak dengeli bir formülasyon sunar. Bu da DL'nin çok yüksek olmadığı, ancak stabilite ve biyouyumluluk açısından avantajların tercih edildiği durumlarda NP-6'yı iyi bir aday yapar.

Sonuç olarak, sadece DL değerine odaklanıldığında NP-8, yüksek etkin madde yüklemesi sayesinde en dikkat çekici partikül olsa da, üretim verimi ve pratik kullanımı göz önünde bulundurulduğunda, DL'yi dengeleyen stabilite ve boyut gibi diğer parametreler dikkate alınarak NP-6 daha genel bir avantaj sunmaktadır. Optimal partikül seçimi, hedeflenen uygulama ve önceliklere bağlı olarak değişebilir [167].

4.3.3 Enkapsülasyon Etkinliği

Nanopartiküller içerisine yüklenen etken madde miktarı, santrifüj işleminden sonra elde edilen üst fazların konsantrasyonlarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Çöktürme ve yıkama süreçlerinden elde edilen bu üst fazlar, enkapsülasyon etkinliği ve yükleme oranını hesaplamak için kullanılmıştır. Üst fazlarda kalan etken madde miktarı, 325,5 nm ve 332,5 nm dalga boylarında UV absorbans ölçümleri yapılarak ve bu ölçümlere dayalı kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 4. 2). Bu sayede, nanopartiküller içine yüklenmeyen RA moleküllerinin miktarı tespit edilmiştir.

Enkapsülasyon etkinliği, etken maddenin nanopartikül yapısına başarılı bir şekilde yüklenme oranını ifade eder [168]. Örneğin, NP-5 formülasyonunda %46,66 gibi yüksek bir etkinlik elde edilirken, NP-2'de bu oran yalnızca %6,13 olarak hesaplanmıştır. Yüksek etkinlik genellikle polimer ve çözücü arasındaki uyumun iyi olduğu, uygun sonikasyon koşulları ve yeterli stabilizatör kullanıldığı durumlarda gözlemlenir. Buna karşılık, etken madde miktarının gereğinden fazla

artırılması etkinliği azaltabilir, çünkü yükleme kapasitesini aşan fazla miktar nanopartikül yerine dış fazda kalır. Ayrıca, NP-2 örneğinde düşük sonikasyon gücü ve uzun süreli emülsiyonlama işleminin etkinlikteki düşüşte rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, çözücü seçimi ve stabilizatör miktarı (örneğin PVA oranı) da bu sürece doğrudan etki eden önemli faktörler arasındadır.

Hücre kültürü çalışmaları için optimize edilmiş bir formülasyon olan 3 mg RA ve 75 mg PLGA içeren nanopartiküle (NP-6), 0,99 mg RA yüklemiş ve bu formülasyonun enkapsülasyon etkinliği %33 olarak hesaplanmıştır.

Etkin madde yükleme oranı, nanopartiküller içerisine yüklenen toplam etken madde miktarını ifade eder ve ilaç taşıyıcı sistemlerin başarısını değerlendirmede kritik bir göstergedir. Örneğin, 1 mg RA ve 50 mg PLGA ile hazırlanan NP-8 formülasyonunda %61 gibi yüksek bir enkapsülasyon etkinliği elde edilmiştir. Bu durum, yeterli PLGA miktarının yanı sıra, uygun emülsiyonlama ve sonikasyon koşullarının uygulanmasından kaynaklanmıştır. Ancak, 3 mg RA ve 75 mg PLGA içeren NP-2 formülasyonunda, yalnızca %6,13 gibi düşük bir enkapsülasyon etkinliği gözlemlenmiştir. Bu düşüş, fazla polimer miktarının emülsiyonlama sürecini olumsuz etkileyerek yetersiz bir yüklenme oluşturmamasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca, çözücünün buharlaşma hızındaki yetersizlik ve stabilizatör miktarındaki uyumsuzluk da yükleme oranını etkileyen önemli faktörlerdir. Yetersiz buharlaşma, etken maddenin nanopartiküller yerine dış fazda kalmasına yol açarak yükleme oranını düşürür.

4.4 Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyon

Sonuçları

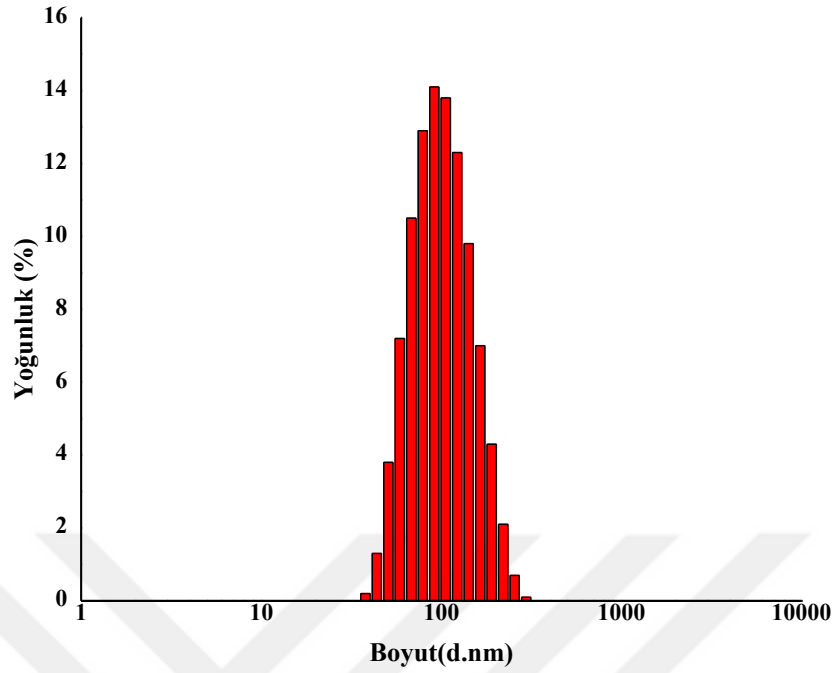
4.4.1 Nanopartiküllerin Boyut Profili ve Çoklu Dağılım İndeksi (PDI) Analizlerinin Değerlendirilmesi

Tablo 4. 2'de, RANP nanopartiküllerinin boyut dağılımı ve çoklu dağılım indeksi (PDI) analiz sonuçları sunulmuştur. Nanopartiküllerin boyutu, biyoyararlanımı ve ilaç salınımını doğrudan etkileyen kritik bir parametredir. Daha küçük partiküller (örneğin, NP-7'de 50,8 nm) geniş bir yüzey alanı sağlayarak biyoyararlanımı artırırken, daha büyük partiküller (örneğin, NP-4'te 1897 nm) etkili bir ilaç salınım

mekanizması oluşturmaz. Bu boyut farklılıkları, polimer miktarı, sonikasyon süresi ve gücü gibi üretim parametrelerinden etkilenmektedir. NP-7’de yüksek sonikasyon gücü ve kısa süreli işlem sayesinde daha küçük partiküller elde edilirken, NP-4’te yüksek polimer ve stabilizatör oranı partikül boyutlarının büyümesine neden olmuştur.

Nanopartiküllerin boyut analizi ve PDI değerleri, Zetasizer Nano Z cihazı kullanılarak üç tekrarlı yapılmıştır. RANP-6 formülasyonunun ortalama partikül boyutu $93,42 \pm 4,11$ nm olarak tespit edilmiştir. Elde edilen nanopartiküller arasında, RANP-6, en homojen boyut dağılımına ve en küçük partikül boyutlarına sahip formülasyon olarak belirlenmiştir. Ayrıca, RANP-6’nın PDI değeri $0,115 \pm 0,017$ olarak ölçülmüştür (Tablo 4. 2). Bu sonuçlar, RANP-6’nın dar ve homojen bir boyut dağılımı gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Glioblastom tedavisindeki en önemli zorluklardan biri, kan-beyin bariyerinin (KBB) oluşturduğu geçirgenlik kısıtlamasıdır. KBB, endotel hücrelerinden oluşan ve eksojen materyallerin, patojenlerin ve kemoterapötik ajanların geçişini büyük ölçüde kısıtlayan bir savunma mekanizmasıdır. Bununla birlikte, 200 nm’nin altındaki hidrofobik nanopartiküllerin KBB’yi geçebilme potansiyeli bulunmaktadır. Bu nedenle, nanopartikül boyutu, KBB’yi aşmayı hedefleyen kemoterapötik ajanların tasarımında kritik bir öneme sahiptir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, üretilen nanopartiküllerin boyutlarının glioblastom tedavisinde KBB engelini aşmada herhangi bir sorun oluşturmayacağını göstermektedir [169], [170].



Şekil 4. 5 RANP'nin boyut dağılım profili

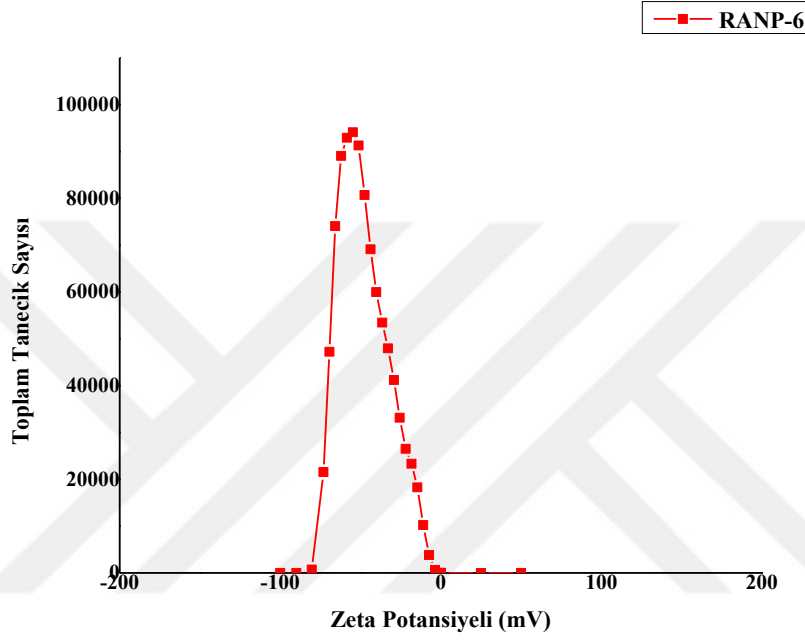
4.4.2 Nanopartiküllerin Elektriksel Yüzey Yükü Potansiyelinin (Zeta Potansiyeli) İncelenmesi

Elektriksel Yüzey yükü (Zeta potansiyeli), analizi nanopartiküllerin yüzey yükünü ve stabilitesini belirlemede önemli bir parametredir. Bu çalışmada, RANP-6'nın zeta potansiyeli $-42,1 \pm 5,4$ mV olarak ölçülmüştür. Yüksek negatif zeta potansiyeli, partiküller arasındaki itici kuvveti artırarak agregasyonu önler ve partiküllerin stabilitesini destekler. Genellikle, ± 30 mV'den büyük zeta potansiyeli, elektriksel itme nedeniyle parçacıklar arasındaki teması engelleyerek nanotaşıyıcı dispersiyonunu stabilize eder [171]. Araştırmalar, bu özellik sayesinde nanopartiküllerin biyolojik ortamlarda daha kararlı hale geldiğini ve ilaç taşıma kapasitelerinin arttığını göstermektedir [172].

Hücre yüzeylerinin genellikle negatif yüklü olması, nanopartiküllerin hücresel alımını sınırlayabilir. Ancak, bu durum kan-beyin bariyeri (KBB) gibi zorlu bariyerleri hedefleyen uygulamalarda avantaj sağlayabilir. KBB, hücreler arası sıkı bağlantılar nedeniyle genellikle büyük ve pozitif yüklü moleküllerin geçişine direnç gösterir. Buna karşın, negatif yüzey yüklü ve küçük boyutlu nanopartiküller, pasif

difüzyon veya reseptör aracılı mekanizmalar yoluyla bu bariyeri daha kolay aşabilir.

Ayrıca, negatif zeta potansiyeli nanopartiküllerin opsonizasyonunu azaltarak dolaşım sürelerini uzatır ve hedefe ulaşma oranını artırır. Bu nedenle, nanopartiküllerin yüzey yükü, ilaç taşıma sistemlerinin tasarımında dikkate alınması gereken kritik bir özelliktir.



Şekil 4. 6 RANP’ye ait zeta potansiyel grafiği

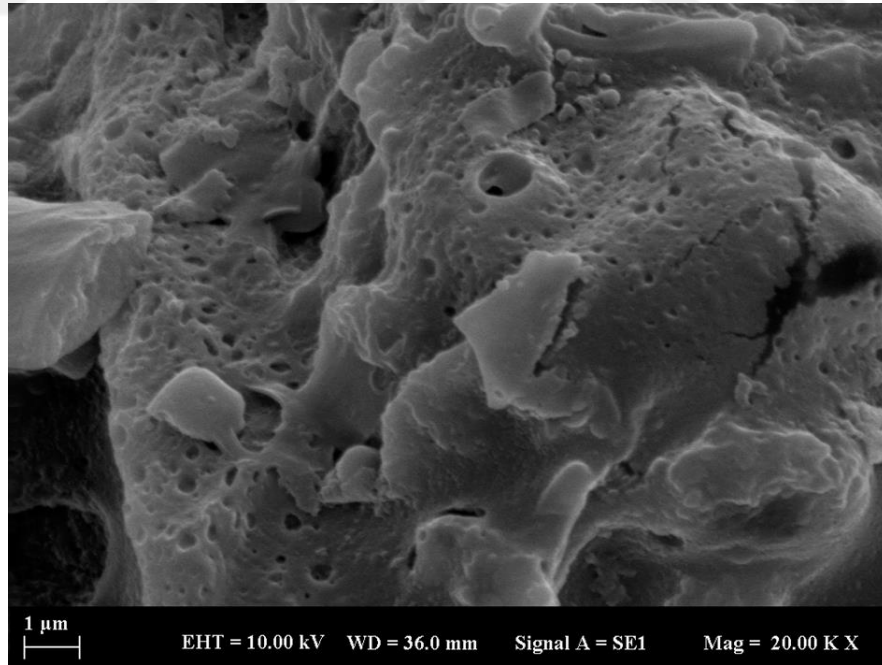
4.4.3 Nanopartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Şekil 4.7’de sunulan SEM görüntüsü, RA (rosmarinik asit) yüklü PLGA (polilaktik-ko-glikolik asit) bazlı nanopartiküllerin yüzey morfolojisini değerlendirmek için kullanılmıştır. Numuneler, altın (Au) kaplama işlemi ile hazırlanmış ve 10.00 kV hızlanma gerilimi altında 20.000x büyütme ile analiz edilmiştir. Görüntü, nanopartiküllerin pürüzlü ve gözenekli bir yüzey yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Bu özellikler, yüzey alanını artırarak ilaç yükleme kapasitesini ve kontrollü salım mekanizmalarını optimize etmek için avantaj sağlamaktadır.

Görüntüde, nanopartiküllerin pürüzlü bir yüzey yapısına sahip olduğu açıkça görülmektedir. Bu pürüzlü yüzey, yüzey alanını artırarak ilaç yükleme kapasitesini ve kontrollü salım mekanizmalarını optimize etmek için önemli bir avantaj sunabilir. Ayrıca, yüzeyde gözenekli bölgelerin varlığı dikkat çekicidir.

Gözeneklerin nanometre ölçeğinde ve düzensiz bir şekilde dağılmış olması, partiküllerin üretim sürecinde kullanılan emülsiyon-solvent buharlaştırma tekniğinin bir sonucu olabilir. Bu tür gözenekli yapı, yüklenen ilaç moleküllerinin daha uzun süreli ve kontrollü bir şekilde salınmasını destekleyebilir. Bazı partiküllerin aglomere olduğu ve düzensiz kümeler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, çözücü buharlaşma hızı, karıştırma koşulları ve stabilizatör miktarı gibi üretim parametrelerinden etkilenmektedir. Örneğin, çözücünün yavaş buharlaşması durumunda partiküller düzgün bir şekilde şekillenebilirken, hızlı buharlaşma yüzeydeki pürüzlü yapının yanı sıra partiküller arası yapışmayı artırabilir [162]. Keskin kenarlı yapı ve düzensiz yüzey detayları ise polimerizasyon ve sertleşme süreçlerinden kaynaklanmaktadır. Bu morfolojik özellikler, nanopartiküllerin biyolojik uyumluluğunu ve ilaç salım kinetiğini doğrudan etkilemektedir.

Sonuç olarak, RA yüklü PLGA nanopartiküller, pürüzlü ve gözenekli yapıları sayesinde kontrollü salım için uygun özelliklere sahipken, aglomerasyonun azaltılması için üretim süreçlerinin optimize edilmesi gerekmektedir. Bu tür analizler, nanopartiküllerin ilaç taşıma sistemlerindeki etkinliğini artırmak için kritik öneme sahiptir.



Şekil 4. 7 RANP’lerin 20.000x büyütme ile SEM analizi sonucu elde edilen morfolojik görüntüsü

4.4.4 Nanopartiküllerin Fonksiyonel Gruplarının FT-IR Spektroskopisi ile İncelenmesi

Bir maddenin kimyasal yapısını incelemek ve moleküler düzeydeki fonksiyonel grupları belirlemek için kullanılan Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), etkili bir analitik tekniktir. FTIR, kızılötesi (IR) ışığın bir numuneden geçirilmesi ile çalışır. Numunedeki moleküller, ışığı belirli frekanslarda emer veya iletir. Bu frekanslar, moleküllerin bağ türüne ve titreşim hareketlerine bağlı olarak değişir. Moleküllerdeki atomlar birbirine bağlandığında, bu bağlar titreşim yapar. Titreşimler, genellikle "gerilme titreşimleri" (stretching) ve "bükülme titreşimleri" (bending) olarak iki ana kategoriye ayrılır [173]. Karbonil (C=O) grubu, çift bağlı bir karbon ve oksijen atomundan oluşur ve bu bağın titreşim frekansı oldukça karakteristiktir. Karbonil gerilme titreşimi, karbonil bağının uzayıp kısılma hareketinden kaynaklanır ve FTIR spektrumunda genellikle 1650–1750 cm^{-1} aralığında bir pik olarak gözlenir. Bu pik, moleküldeki ester, keton, aldehit veya karboksilik asit gibi karbonil gruplarının varlığını belirlemek için önemli bir işarettir.

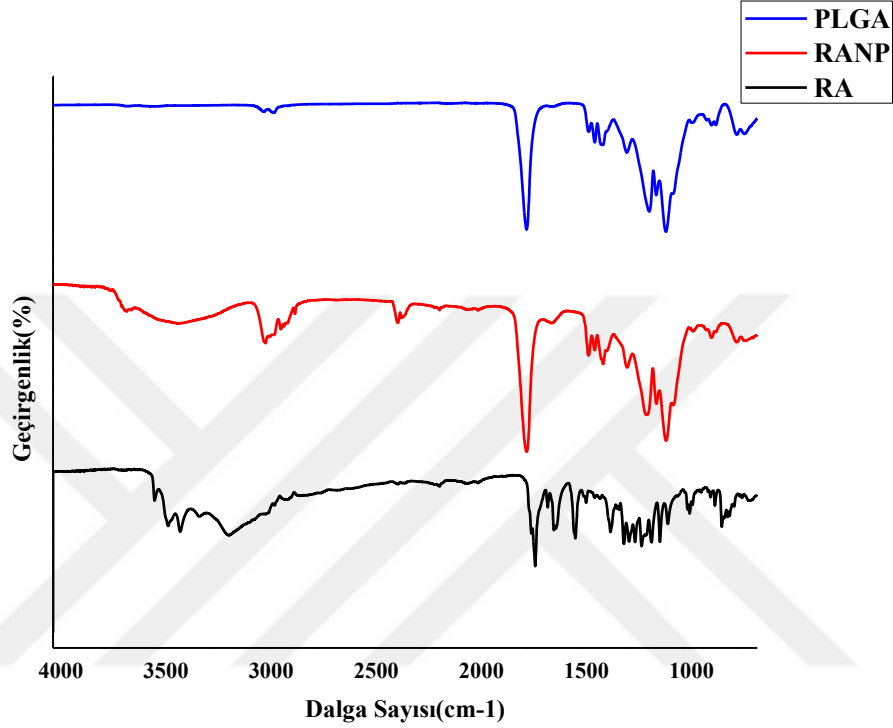
Bu çalışmada, FTIR analizi kullanılarak üretilen nanopartiküllerin yüzeyindeki fonksiyonel gruplar tespit edilmiş ve etken maddelerin nanopartiküllerle etkileşimleri incelenmiştir. Şekil 4.8'de gösterildiği üzere, FTIR analizi, üretilen nanopartiküllerin kimyasal yapısını doğrulamak ve etken maddelerin nanopartiküllerle etkileşimlerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. FTIR analizinde, PLGA, rosmarinik asit (RA) ve rosmarinik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin (RANP) spektrumları karşılaştırılmıştır.

PLGA'nın FTIR spektrumunda, ester gruplarına özgü olarak yaklaşık 1750 cm^{-1} 'de karbonil (C=O) gerilme titreşimleri ve 1050–1250 cm^{-1} aralığında C–O gerilme titreşimlerine ait belirgin pikler gözlemlenmiştir. RA'nın spektrumunda ise, 3200–3500 cm^{-1} aralığında fenolik OH gruplarına, 1700 cm^{-1} civarında karboksilik asit karbonil gruplarına ve 1500–1600 cm^{-1} arasında aromatik C=C titreşimlerine ait karakteristik pikler tespit edilmiştir.

RANP spektrumu hem PLGA hem de RA'ya özgü karakteristik piklerin varlığını göstermektedir. Ancak, bazı hafif kaymalar gözlemlenmiştir; bu da nanopartikülün dış yüzeyinde ilaç tutunduğunu gösterir. Ayrıca sentez sırasında PLGA ve RA arasında fiziksel veya zayıf kimyasal etkileşimlerin gerçekleştiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, yeni piklerin oluşmaması, etkileşimlerin sadece fiziksel bağlanma ile sınırlı olduğunu ve iki bileşenin kimyasal yapılarının

korunduğunu ortaya koymaktadır.

Bu sonuçlar, PLGA ve RA'nın uyumlu bir şekilde birleşerek stabil nanopartikül yapıları oluşturduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca, nanopartiküllerin kimyasal yapısının FTIR ile incelenmesi, sentez sürecinde malzemelerin özelliklerinin korunduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 8 PLGA, RA ve RANP'nin FT-IR spektrumları

4.5 Nanopartiküllerin *In Vitro* Salım Profili ve Değerlendirilmesi

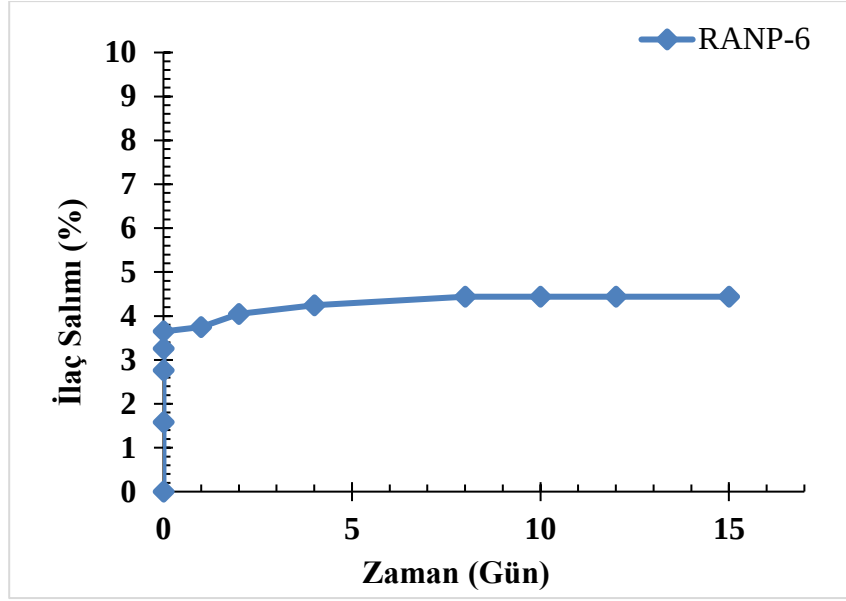
Sentezlenen RA yüklü PLGA nanopartiküllerinin salım profili, PBS (pH: 7,4) içinde 37°C'de, yatay çalkalamalı bir ortamda 15 gün boyunca kontrol edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında alınan örnekler, 9000 rpm'de santrifüjlenerek UV-spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda RA'nın salım profili çizilmiş ve 15 gün boyunca elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir. İlk dört saat içinde %3,64, birinci gün sonunda %3,74, ikinci gün sonunda %4,04 ve bir hafta sonunda %4,24 oranında salım gözlemlenmiştir. 15. gün itibarıyla RA salımı sabit bir değere ulaşmıştır.

Literatürde PLGA nanopartiküllerine farklı etken maddelerin enkapsülasyonu ile elde edilen salım profilleri incelendiğinde, bu çalışmada gözlemlenen sonuçların

bazı farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Bu durum, kullanılan etken maddenin kimyasal özellikleri, PLGA polimerinin fizikokimyasal yapısı ve üretim sırasında uygulanan yöntem ve parametrelerle ilişkilendirilebilir. Öncelikle, RA'nın fenolik ve karboksilik asit gruplarına sahip olması nedeniyle hem hidrofilik hem de lipofilik özellikler göstermesi, PLGA matrisiyle fiziksel etkileşimlerinin sınırlı kalmasına yol açabilir. Bu da RA'nın matriste daha stabil bir şekilde tutulmasını ve düşük salım oranlarını açıklar. Küçük boyutlu nanopartiküllerde gözlemlenen "burst (patlama) etkisi", bu çalışmada çok düşük düzeyde gözlenmiş ve nanopartiküller, etken maddeyi kontrollü bir şekilde salmıştır. Ayrıca, PLGA'nın yüksek moleküler ağırlığı ve muhtemel laktik/glikolik oranı, polimerin hidrolizini ve bozunma hızını yavaşlatmış, bu durum salım kinetiğine doğrudan etki etmiş olabilir.

Üretim sürecinde kullanılan emülsiyon-solvent buharlaştırma yöntemine bağlı olarak, RA'nın polimer matrisi içinde homojen bir şekilde dağılmadığı ve yüzeye daha yakın konumlandığı düşünülebilir. Bu da başlangıçtaki düşük miktarda hızlı salımın (burst etkisi) nedenlerinden biri olabilir. Bununla birlikte, karıştırma hızı, stabilizatör miktarı ve çözücü buharlaşma hızının optimize edilmemesi, partikül yüzeyinde gözlemlenen düzensizliklere ve aglomerasyon gibi durumlara yol açmış olabilir. Bu faktörler, nanopartiküllerin yüzey morfolojisini ve salım davranışını etkileyerek literatürdeki farklı sonuçlarla karşılaştırıldığında bu çalışmada gözlemlenen düşük salım oranını açıklamaktadır.

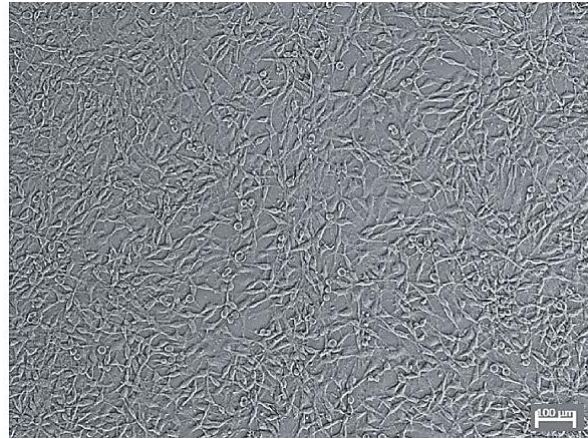
Sonuç olarak, RA yüklü PLGA nanopartikülleri, kontrollü salım uygulamaları için umut vadeden bir yapıya sahiptir. Bununla birlikte, salım profillerinin optimize edilmesi ve literatürdeki farklı çalışmalara daha yakın sonuçlar elde edilmesi için; düşük moleküler ağırlığına sahip PLGA, stabilizatör türü ve oranı, çözücü seçimi, buharlaşma ve karıştırma hızı, gibi üretim parametrelerinin daha hassas bir şekilde düzenlenmesi gerekmektedir. Bu çalışma, PLGA bazlı nanopartiküllerin ilaç salım sistemlerinde etkin bir taşıyıcı platform olarak kullanılabileceğini gösterirken, nanopartikül tasarımında kullanılan parametrelerin optimizasyonunun önemini vurgulamaktadır.



Şekil 4. 9 RANP'nin in vitro salım profili

4.6 Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin U87MG İnsan Glioblastoma Hücre Hattı Üzerindeki *In Vitro* Aktiviteleri

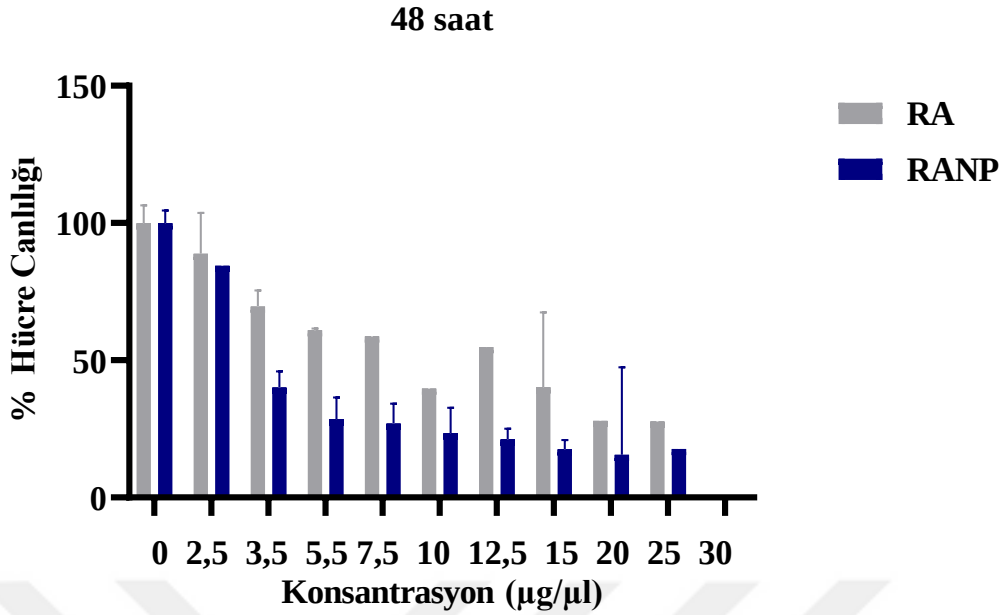
Üretilen RA yüklü nanopartiküllerin *in vitro* etkinlikleri, U87MG insan glioblastoma hücre hattı kullanılarak yapılan hücre kültürü çalışmalarında incelenmiştir. U87MG hücre hattı, %10 FBS ile desteklenmiş DMEM besiyerinde, hücre büyümesi için optimize edilmiş 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren bir inkübatörde başarıyla kültüre edilmiştir. Bu uygun koşullar altında hücrelerin proliferasyonu ve canlılığı sağlanmış, elde edilen morfolojik yapılar dikkatle incelenmiştir. Kültür sürecine bağlı olarak gözlemlenen hücre morfolojisi, Şekil 4.10'da detaylı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4. 10 U87MG insan glioblastoma hücrelerinin invert mikroskop ile 10x objektif altında elde edilmiş mikrografik görüntüsü

4.6.1 Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücrelerinde Sitotoksik Aktivitesinin Değerlendirilmesi

RANP'lerin U87MG hücrelerindeki sitotoksik etkisi, 48 saatlik inkübasyon süresi boyunca Rosmarinik Asit (RA) ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Bu çalışma kapsamında, serbest RA ve RANP'den salınan madde miktarına eşit olacak şekilde dozlar hesaplandı. Farklı doz konsantrasyon aralıklarında RA ve RANP, U87MG hücrelerine uygulandı. Serbest RA ve RANP, 2,5 µg/ml, 3,5 µg/ml, 5,5 µg/ml, 7,5 µg/ml, 10 µg/ml, 12,5 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, ve 50 µg/ml, gibi artan 10 farklı konsantrasyonda, üç tekrarlı olarak mikropalakalar üzerine uygulandı. 48 saatlik inkübasyon sonrasında hücrelerdeki sitotoksik etkinlik, MTT yöntemiyle belirlendi. MTT testi, hücre canlılığını ölçmek için yaygın olarak kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Bu test, sarı renkteki MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) tuzlarının indirgenmesiyle gerçekleşir [174]. Canlı hücrelerde, özellikle mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından, NADH ve NADPH gibi elektron taşıyıcıları kullanılarak MTT tuzları indirgenir ve mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Ölü hücrelerde ise bu reaksiyon gerçekleşmez çünkü hücrelerin metabolik aktiviteleri durmuştur, dolayısıyla renk değişimi gözlemlenmez. Elde edilen mor formazan kristallerinin yoğunluğu, hücre canlılığının bir göstergesi olarak spektrofotometre ile ölçülür. Bu yöntem, hücrelerin canlılık oranlarını hızlı ve güvenilir bir şekilde belirlemeye imkân tanır [175]. Formazan kristallerinin absorbansı, ELISA cihazı ile 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Hücrelerdeki sitopatolojik değişiklikler kontrol grubu ile karşılaştırılarak GraphPad yazılımı kullanılarak hücre canlılık oranları hesaplanmış ve 48 saat sonunda IC₅₀ değerleri belirlenmiştir.



Şekil 4. 11 RA'nın U87MG hücre canlılığına 48 saat süre ile etkisi

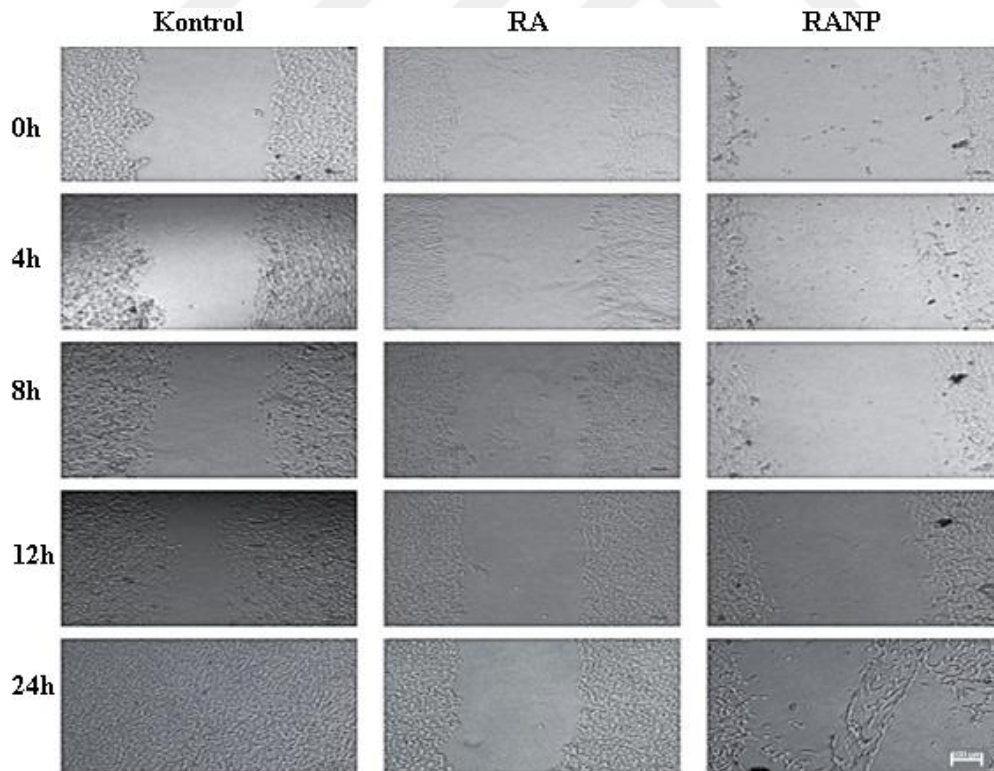
Serbest RA ve RANP, 2,5 µg/ml, 3,5 µg/ml, 5,5 µg/ml, 7,5 µg/ml, 10 µg/ml, 12,5 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml ve 30 µg/ml konsantrasyonlarında 48 saat süreyle incelenmiştir. Şekil 4.11'de görüldüğü üzere, 2,5 µg/ml serbest RA uygulanan U87MG hücrelerinde hücre canlılığı %88 olarak ölçülürken, aynı konsantrasyonda RANP uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %84 olarak belirlenmiştir. 3,5 µg/ml konsantrasyonunda, serbest RA ile hücre canlılığı %69 iken, RANP uygulamasında bu oran %40'a düşmüştür. RANP'nin artan konsantrasyonlarının, hücre canlılığını belirgin şekilde azalttığı gözlemlenmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonunda, IC₅₀ değerleri serbest RA için 8,9 µg/ml ve RANP için 4,5 µg/ml olarak hesaplanmıştır. IC₅₀ analizine göre, RANP formülasyonu, serbest RA'ya kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda etkili olmuş ve hücrelerin yarısını inhibe etmiştir.

Bu sonuçlar, RANP'nin serbest RA'ya göre daha güçlü bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Nanopartikül formülasyonu, aktif bileşenin hücrelere daha etkili taşınmasını sağlamış ve daha düşük konsantrasyonlarda yüksek sitotoksik etki göstermiştir. Bu da RANP'nin, serbest RA'ya kıyasla daha etkili bir tedavi seçeneği olabileceğini işaret etmektedir.

4.6.2 Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücreleri Üzerindeki Hücre Göçü Etkisi

Bu çalışmada, hücre göçü ve yara kapanma süreçlerini değerlendirmek için 2D yara iyileşme testi kullanılmıştır. Bu yöntem, hücre monolayer'ine pipet yardımıyla mekanik bir yara oluşturulmasını, yara kapanma sürecinin mikroskop ile izlenmesini ve hücre hareketlerinin detaylı bir şekilde kaydedilmesini kapsamaktadır. Hücre göçü, doku yenilenmesi ve yara iyileşmesi gibi olumlu süreçlerde kritik bir rol oynarken, aynı zamanda invazyon ve metastaz gibi kanserin temel mekanizmalarında da büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, glioblastoma gibi agresif ve invazif kanser türlerinde hücre göçünün baskılanması, terapötik müdahaleler açısından temel hedeflerden biridir.

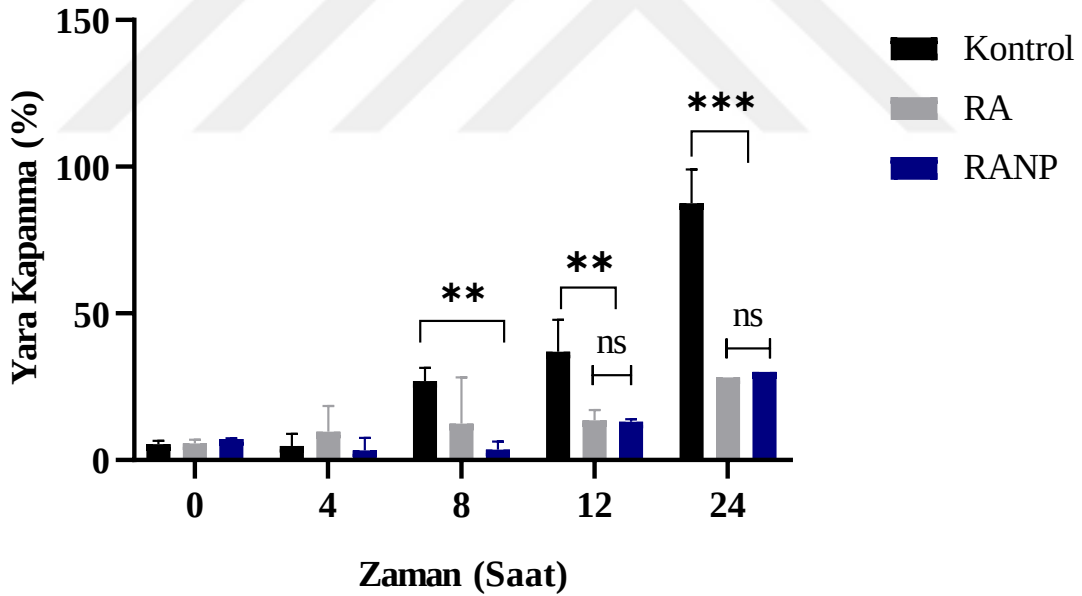
Çalışmada, RA (Rosmarinik Asit) ve RANP'nin (Rosmarinik Asit yüklü PLGA Nanopartikülü) belirlenen 48. saat IC_{50} dozları kullanılarak, U87MG insan glioblastoma hücre hattında oluşturulan yara modeli üzerinde etkileri incelenmiştir. Hücre göçü ve yara kapanma oranları 0, 4, 8, 12, 24 ve 48. saatlerde mikroskopla takip edilmiştir. (Şekil 4. 12)



Şekil 4. 12 RA ve RANP'nin U87MG hücre göçüne etkisi

Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubunda yara kapanması 24 saat içinde %100 oranında gerçekleşmiştir. Buna karşın, RA ve RANP uygulanan gruplarda yara kapanma oranlarının sırasıyla %30 ve %35 seviyelerinde kaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, RA ve RANP'nin U87MG hücrelerinin göç yeteneğini anlamlı derecede baskıladığını ve invazyonu önleyici bir potansiyele sahip olduklarını ortaya koymaktadır.

RANP'nin serbest RA'ya kıyasla daha yüksek bir yara kapanma oranı göstermesi, nanopartikül taşıma sisteminin ilaç salımında daha kontrollü ve hedefe yönelik bir mekanizma sunduğunu gösterebilir. Bununla birlikte, serbest RA'nın daha güçlü bir hücre göçü engellemesi sağlaması, nanopartiküllerin biyolojik aktivitesinin serbest forma göre bir miktar düşük olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, PLGA (Polilaktik-ko-glikolik asit) enkapsülasyonunun, rosmarinik asitin biyoyararlanımını artırırken, ilacın salım kinetiklerini düzenlemesinden kaynaklanıyor olabilir.



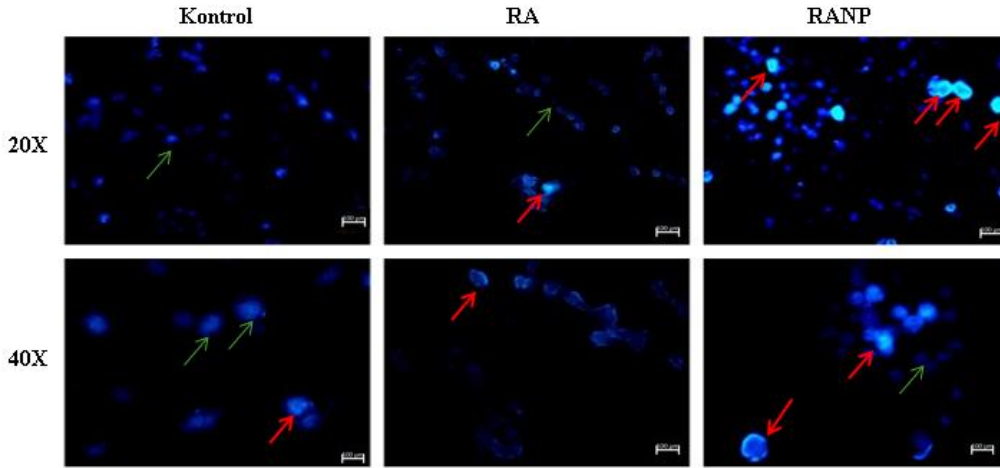
Şekil 4. 13 RA ve RANP'nin U87MG insan glioblastoma hücre hattında yara kapanma süreci üzerindeki etkilerinin yüzdesel gösterimi

Sonuç olarak, RA ve RANP'nin U87MG insan glioblastoma hücre hattı üzerindeki hücre göçü ve yara kapanma süreçlerini baskıladığı gösterilmiştir. Bu bulgu, RA ve RANP'nin metastazı önlemek veya yavaşlatmak amacıyla yardımcı bir tedavi

yöntemi olarak değerlendirilme potansiyelini desteklemektedir. Özellikle RANP, kontrollü ilaç salımı sayesinde hedeflenmiş tedavilerde önemli bir araç olabilir. Ancak, *in vitro* ilaç salınımı deneyinde RANP lerin 15. günde hala %4,5 ilaç saldıgını düşünürsek nanopartiküllerin serbest forma göre etkinlik farklarının fazla olduğu ve bir optimizasyon gerektiği düşünülmektedir. Çalışma, RA ve RANP'nin terapötik etkilerini daha kapsamlı araştırmalarla desteklemek ve glioblastoma gibi invazif kanser türlerinde kullanılabilirliğini değerlendirmek için önemli bir temel oluşturmaktadır [176].

4.6.3 Rosmarinik Asit Yüklü Nanopartiküllerin U87MG İnsan Glioblastoma Hücre Hattı Üzerinde Apoptozis Tespiti İçin DAPI Boyama

Yara iyileşmesi testi tamamlandıktan sonra, 48. saat sonunda hücrelerde apoptoz varlığını değerlendirmek amacıyla DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) boyama yöntemi uygulanmıştır (Şekil 4.14). Bu yöntem, DNA'ya yüksek afiniteyle bağlanan floresan bir boya olan DAPI'nin, apoptotik hücrelerin çekirdek morfolojisini değerlendirmek için kullanılması esasına dayanmaktadır. Hücreler, %100'lük metanol ile sabitlendikten sonra DAPI ile boyanmış ve floresan mikroskop altında incelenmiştir. Apoptotik hücreler, kromatin yoğunlaşması ve çekirdek fragmantasyonu gibi karakteristik morfolojik değişikliklere dayanılarak tespit edilmiştir. Görüntüleme sırasında, RA ve RANP uygulanan gruplarda apoptotik hücrelerin oranında artış olduğu gözlenmiştir. Bu durum, RA ve RANP'nin hücre göçünü baskılayanın yanı sıra, apoptotik hücre ölümünü tetikleyici etkilerinin de olabileceğini göstermektedir. Literatürde apoptoz sırasında çekirdek DNA'sında fragmantasyonun yaygın olduğu, bunun da DAPI boyama ile belirgin bir şekilde görselleştirilebildiği belirtilmektedir [177]. DNA'nın parçalanması sonucunda kromatin kümelenmesi ve çekirdek çökmesi gibi yapısal değişimler meydana gelir. Sağlıklı hücre çekirdekleri düzgün bir yapı sergilerken, apoptotik hücreler bu tür değişimlerle tanımlanır. Bu nedenle DAPI boyama yöntemi, apoptotik hücre ölümünü tespit etmek ve hücre çekirdeğindeki morfolojik değişiklikleri incelemek için güçlü ve yaygın olarak kullanılan bir tekniktir.



Şekil 4. 14 RA ve RANP'nin 48 saatlik uygulama sonrası U87MG insan glioblastoma hücre hattında apoptozun DAPI boyaması ile 20x ve 40x büyütmelerde gösterimi, kırmızı oklar apoptotik hücreleri, yeşil oklar sağlıklı hücreleri göstermektedir

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında RA ve RANP uygulamalarının U87MG insan glioblastoma hücre hattında apoptotik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda çekirdek yapılarının homojen, yuvarlak ve düzenli olduğu görülürken, RA ve RANP gruplarında kromatin yoğunlaşması, çekirdek deformasyonu ve parçalanması gibi apoptoza özgü morfolojik değişimler tespit edilmiştir. RA uygulamasında apoptotik hücreler belirli bölgelerde gözlenirken, RANP uygulamasında daha yoğun bir apoptotik etki ortaya çıkmış, özellikle kromatin yoğunlaşması ve çekirdek fragmentasyonu daha belirgin hale gelmiştir. Bu durum, RANP'nin apoptoz indüksiyonunda daha etkili bir rol oynadığını göstermektedir. DAPI boyamasının, floresan mikroskop altında apoptotik hücreleri belirlemede etkili bir yöntem olduğu bu çalışmayla doğrulanmıştır. Görsel analizler 20x ve 40x büyütmelerle yapılmış, apoptotik hücrelerin özellikleri net bir şekilde ortaya konulmuştur.

4.6.4 Rosmarinik Asit'in U87MG İnsan Glioblastoma Hücre Hattı Üzerinde Apoptoz İndüksiyonun Gen Düzeyinde Gösterimi

Apoptoz, hücrelerin programlı ölümü olarak tanımlanan ve organizma homeostazını korumada kritik rol oynayan bir biyolojik süreçtir. İçsel ve dışsal sinyallerle tetiklenebilen bu mekanizma, hücre ölümü kaspaz ailesine ait enzimlerin etkinliğiyle gerçekleştirilir. Ancak kanser hücrelerinde, apoptotik yollar genellikle antiapoptotik proteinlerin aşırı ifadesi ve proapoptotik proteinlerin

yetersizliği nedeniyle baskılanır. Bu durum, kanser hücrelerinin ölümden kaçınmasına ve malign yapılar oluşturmaya neden olur. Bu bağlamda, apoptotik mekanizmaların yeniden aktive edilmesi, kanser tedavisi için stratejik bir hedef olarak değerlendirilmektedir [178].

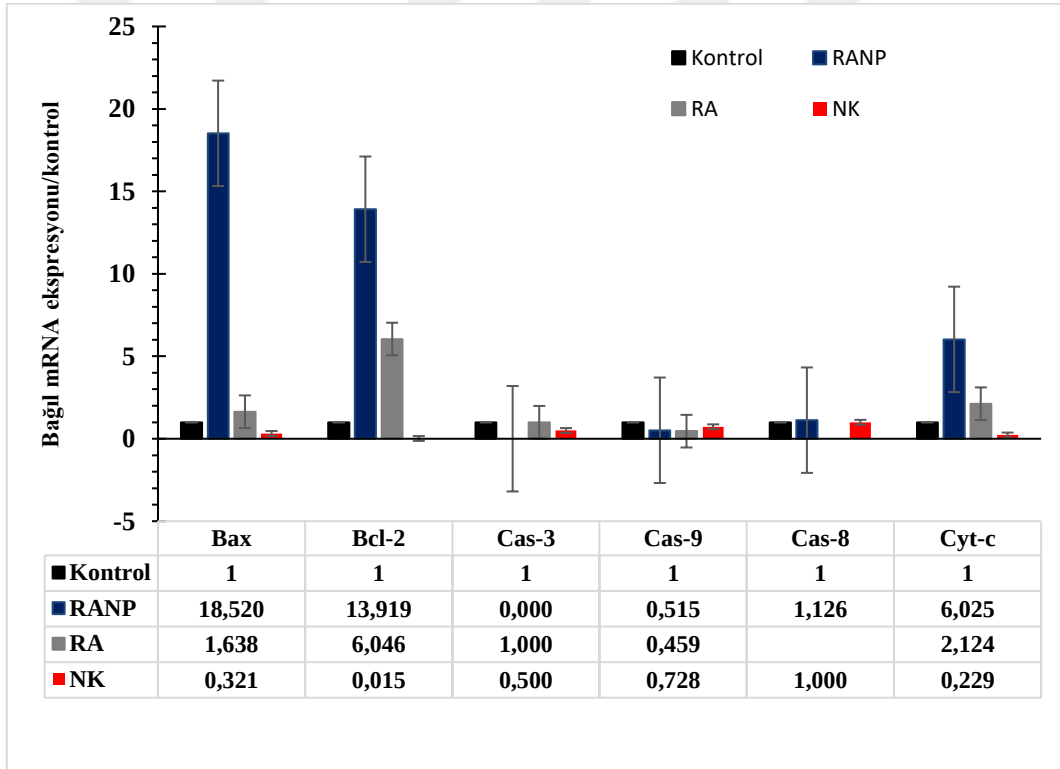
Bu çalışmada, rosmarinik asit (RA) ve RA yüklü nanopartiküllerin (RANP) U87MG insan glioblastoma hücrelerinde apoptotik gen ekspresyonları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Araştırmada, RA ve RANP'nin IC₅₀ değerlerinde 48 saatlik inkübasyon sonrası U87MG insan glioblastoma hücrelerindeki apoptotik genlerin mRNA seviyelerindeki değişimler analiz edilmiştir. Deneyde, ticari kitler kullanılarak hücrelerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve RNA miktarları (Tablo 4. 3) Nanodrop cihazı ile belirlenmiştir. İzole edilen RNA'lar, reverse transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüş ve elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR yöntemiyle analiz edilmiştir [179]. Çalışmada apoptotik süreçte kilit rol oynayan kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, sitokrom-c, Bax ve Bcl-2 genlerinin ekspresyon seviyeleri (Şekil 4.15) belirlenmiştir. Referans gen olarak β -aktin kullanılmış ve bağıl gen ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemiyle hesaplanmıştır [180].

Tablo 4. 3 Nanodrop spektrofotometrik ölçümleri ile elde edilen RNA konsantrasyonu ve saflık değerleri

Örnek	A260/A280	A260/A230	RNA Konsantrasyonu (ng/μl)
Kontrol	2,04	2,15	378,9
RA	2,02	2,21	810,2
RANP	2,02	2,17	675,8

Nanodrop cihazı ile yapılan RNA izolasyonu ölçümleri, RNA örneklerinin saflığını ve protein kontaminasyonunu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan A260/A280 oranını belirlemiştir. Kontrol grubunda bu oran 2,04, Rosmarinik asit (RA) grubunda 2,02 ve RANP grubunda 2,02 olarak ölçülmüştür. Bu değerler,

RNA saflığını değerlendirmek için kabul edilen 1,8-2,0 aralığına uygun olup, protein kontaminasyonunun minimum seviyede olduğunu göstermektedir. Ayrıca, A260/A230 oranları kontrol grubunda 2,15, RA grubunda 2,21 ve RANP grubunda 2,17 olarak ölçülmüştür. Bu oranların 2,0'ın üzerinde olması, kimyasal kalıntıların (fenol, tuzlar veya diğer reaktif maddeler) çok düşük seviyelerde olduğunu ve RNA örneklerinin yüksek saflığa sahip olduğunu doğrulamaktadır. RNA konsantrasyonları kontrol grubunda 378,9 ng/μl, RA grubunda 810,2 ng/μl ve RANP grubunda 675,8 ng/μl olarak tespit edilmiştir. RA ve RANP gruplarında RNA konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre belirgin şekilde yüksek olması, bu bileşiklerin hücresel aktiviteleri etkileyerek RNA sentezini artırmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar, RA ve RANP'nin hücresel düzeyde potansiyel biyolojik etkiler yaratabileceğini desteklemektedir.



Şekil 4. 15 Bax, Bcl-2, kaspaz-3 (Cas-3), kaspaz-9 (Cas-9), kaspaz-8 (Cas-8) ve Sitokrom-c (Cyt-c), genlerinin kontrol grubuna karşı gösterdiği relatif ekspresyon değişimleri (NK;negatif kontrol, RA;rosmarinik asit, RANP; Rosmarinik asit yüklü nanopartikül)

RA ve RANP uygulamalarının U87MG insan glioblastoma hücre hattında apoptotik gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla yapılan bu çalışmada, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda elde edilen veriler, intrinsik apoptotik yolun aktive olduğunu göstermektedir. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) analizi

ile Bax, Bcl-2, Cas-3, Cas-9, Cas-8 ve Cyt-c genlerinin ekspresyon seviyeleri ölçülmüş ve β -aktin geni referans olarak kullanılmıştır. RANP uygulaması sonucunda pro-apoptotik Bax geninin ekspresyon seviyesinde 18,52 kat gibi anlamlı bir artış gözlenirken, anti-apoptotik Bcl-2 geni 13,92 kat artmıştır. RA uygulamasında ise Bax ve Bcl-2 genlerinde sırasıyla 1,64 ve 6,05 kat artış tespit edilmiştir. Bax/Bcl-2 oranındaki bu değişim, apoptotik sürecin lehine bir dengenin oluştuğunu göstermektedir. Bax/Bcl-2 oranı, hücrel apoptozun kilit belirleyicilerinden biri olup, mitokondriyal membran potansiyelindeki kaybın ve apoptozun başlatılmasının önemli bir göstergesidir. Bax, pro-apoptotik bir protein olarak mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneklerinin (MPTP) açılmasını tetikleyerek sitokrom-c salınımını desteklerken, Bcl-2 bu süreci engelleyici bir rol oynar. Bax'ın Bcl-2'ye oranla artışı, intrinsik apoptotik yolun aktive olduğunu düşündürmektedir. RANP uygulamasında Bax/Bcl-2 oranının yüksekliği (yaklaşık 1,33), mitokondriyal geçirgenliğin önemli ölçüde arttığını ve apoptotik sinyal yollarının aktifleştğini işaret etmektedir. Ayrıca, sitokrom c seviyesinin 6,02 kat artışı, RANP'nin mitokondriyal yolağı etkili bir şekilde tetiklediğini ve apoptozun güçlü bir şekilde indüklendiğini göstermektedir. Buna karşılık, serbest RA uygulamasında Bax gen ekspresyonunda yalnızca 1,64 kat, Bcl-2'de ise 6,05 katlık bir artış gözlenmiş, bu da Bax/Bcl-2 oranının 0,27'de kalmasına ve apoptotik sürecin baskılanmasına neden olmuştur. Serbest RA, sitokrom c seviyesinde 2,1 kat artış sağlayarak apoptotik mekanizmayı tamamen devre dışı bırakmasa da, sınırlı etkisi nedeniyle apoptotik yolağı yeterince aktive edememiştir. Sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması, intrinsik apoptotik yolun aktive olduğunu doğrulamaktadır [181], [182]. Ancak, kaspaz-3 ve kaspaz-9 gen ekspresyon seviyelerinde belirgin bir değişim gözlenmemesi, bu yolaktaki aktivasyonun henüz erken aşamalarda olabileceğini düşündürmektedir. Kaspaz-8 ekspresyon seviyelerinde ise anlamlı bir değişim saptanmamış, bu durum apoptotik sürecin ekstrinsik yola bağlı olmadığını desteklemiştir [183].

Sonuç olarak, RANP uygulamasının U87MG insan glioblastoma hücre hattında mitokondriyal (intrinsik) apoptotik yolu aktive ederek hücre ölümünü tetiklediği tespit edilmiştir. Özellikle Bax ve sitokrom-c genlerinde gözlenen anlamlı artış, RANP'nin glioblastoma hücrelerinde apoptoz indüksiyonunda etkin bir rol oynadığını göstermektedir.

5 SONUÇ

Bu çalışma, glioblastoma gibi agresif ve tedavisi güç bir kanser türü için yeni nesil terapötik yaklaşımlar geliştirme amacı taşımaktadır. Bu amaçla, U87MG insan glioblastoma hücre hattında rosmarinik asit (RA) ve RA yüklü polimerik nanopartiküllerin (RANP) biyolojik ve terapötik etkilerini detaylı bir şekilde inceleyerek, kanser tedavisinde yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemlerinin potansiyelini değerlendirmiştir. RA'nın doğal fenolik yapısı ile bilinen antioksidan ve antikanser özelliklerinin, kontrollü salım sağlayan nanopartikül formülasyonları ile birleştirilmesi, daha etkili bir tedavi stratejisi oluşturma potansiyeli taşımaktadır.

Çalışma kapsamında RANP, tekli emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile sentezlenmiş ve elde edilen nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri detaylı bir şekilde karakterize edilmiştir. Üretilen nanopartiküllerden, homojen bir dağılım ve yüksek stabilite sergileyen RANP-6 formülasyonunun, reaksiyon verimi (RV) %69, Enkapsülasyon Etkinliği (EE) %37,5±9, ve Etken yükleme verimi (DL) ise %0,05 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4. 2). Üretilen nanopartiküllerin ortalama boyutu 93,42±4,11 nm, PDI değeri 0,115±0,017 ve zeta potansiyeli -42,1±5,4 mV olarak belirlenmiştir. Bu fizikokimyasal özellikler, RANP-6'nın ilaç taşıma sistemi olarak kullanımında yüksek stabilite, etkin kapsülleme, kontrollü salım ve hedef dokuya yönelik yüksek biyoyararlanım potansiyelini desteklemektedir. Yüksek stabilite, etkin kapsülleme ve kontrollü salım, ilacın tedavi süresince etkinliğini artırırken, hedef dokuya yönelme ve biyoyararlanım avantajları ile yan etki riskini azaltır. Bu nedenle hem farmasötik etkinlik hem de güvenlik açısından ideal bir profil sunmaktadır. Bu özellikler, RANP-6'nın kanser tedavisi gibi zorlu terapötik alanlar için hem *in vitro* hem de potansiyel *in vivo* uygulamalarda uygun ve umut verici bir aday olduğunu göstermektedir.

RANP'nin 15 günlük *in vitro* ilaç salım deneylerinde yalnızca %4,56 oranında aktif

madde salımı gözlemlenmiştir. Bu düşük salım oranı, RANP'nin kontrollü ve uzun süreli bir ilaç salım profili sunduğunu ve tedavi etkinliğinin zamana yayılarak artırılabilceğini göstermektedir. Diğer bir deyişle, bu durum nanopartiküllerin ilacı sıkıca tutarak kontrollü bir salım sağlama potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir. Özellikle yavaş salım gerektiren terapötik yaklaşımlar için bu durum avantajlı olabilir. Ancak, salım oranının bu kadar düşük olması, nanopartiküllerin aktif maddeyi biyolojik ortamda yeterince serbest bırakmadığını da gösteriyor olabilir. pH 5,5 ortamında yapılan ilk 24 saatlik salım deneylerinde de benzer düşük salım oranları gözlemlenmiştir, bu da nanopartiküllerin salımını sınırlayan faktörlerin sadece çevresel koşullardan değil, aynı zamanda nanopartiküllerin yapısal özelliklerinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Bu durumu değerlendirirken dikkate alınması gereken bazı noktalar vardır. İlk olarak, ilacın yavaş salımı, toksisiteyi azaltabilir ve tedavi sürecinde daha uzun süreli bir etki sağlayabilir. Bununla birlikte, terapötik etkinin başlaması için yeterli düzeyde ilacın zamanında salınması gerekmektedir. Salım oranının çok düşük olması, terapötik dozun hedef hücrelere ulaşamamasına yol açabilir. Ancak RANP'nin biyolojik etkinliğinin düşük salım oranına rağmen apoptozu tetiklemiş ve yara iyileşmesi testinde başarı sağlamıştır. Ancak yine de RANP'lerin sınırlı salım profili (%4,56) optimize edilerek, daha etkili ve uzun süreli salım mekanizmaları geliştirilebilir.

Sonuç olarak, bu düşük salım oranı, hem kontrollü bir ilaç salım profilini hem de etkin salımın yetersizliğini gösterebilir. Ayrıca, *in vitro* deneylerde kullanılan ortam koşulları (pH, enzimatik içerik gibi) salım üzerinde doğrudan etkili olabilir ve *in vivo* koşullarda bu salım profili farklılık gösterebilir. Bu bağlamda, nanopartiküllerin yapısal özelliklerinin (örneğin, polimer yoğunluğu ve çapraz bağlanma derecesi) yeniden değerlendirilerek optimize edilmesi gerekebilir.

RANP ve serbest RA'nın sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, RANP'nin serbest RA'ya kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda daha yüksek bir sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Serbest RA'nın 48. saatteki IC₅₀ değeri 8,9 µg/ml iken RANP'nin 48. saatteki IC₅₀ değeri 4,5µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu durum, nanopartiküllerin aktif bileşeni hücrelere daha etkili bir şekilde taşıdığını ve glioblastoma hücreleri üzerinde daha

güçlü bir antiproliferatif etki yarattığını göstermektedir. Bu durum, RANP'nin hedef hücrelere daha iyi penetrasyon sağlaması ve kontrollü salım mekanizmasının aktif maddenin etkisini artırmasıyla ilişkilendirilebilir.

Hücre göçü ve yara kapanma testlerinde hem RA hem de RANP'nin hücre göçünü anlamlı derecede baskıladığı tespit edilmiştir. Kontrol grubunda yara kapanma oranı 24 saat içinde %100 olarak gerçekleşirken, RA uygulanan grupta bu oran %30, RANP uygulanan grupta ise %35 seviyelerinde kalmıştır. Bu sonuçlar, her iki tedavi grubunun hücre göçünü etkili bir şekilde inhibe ettiğini, ancak RANP'nin etkinliğinin nanopartiküllerin yavaş salım mekanizmasından kaynaklanan sınırlamalar nedeniyle kısmen düşük kaldığını göstermektedir. RANP'nin hücre göçünü baskılamadaki sınırlı üstünlüğü, etkin maddenin hedef hücrelerde yeterli konsantrasyona ulaşmasının gecikmesi yavaş salım mekanizmasıyla ilişkilendirilebilir. Bu durum, nanopartiküllerin salım kinetiklerinin optimize edilmesiyle iyileştirilebilir ve böylece RANP'nin hücre göçü üzerindeki etkisi artırılabilir. Bununla birlikte, her iki formülasyonun da invazyonu önleyici etkiler sunduğu açıkça görülmektedir. Rosmarinik asidin antiproliferatif etkinliğiyle ilgili literatürle uyumlu olarak, RA'nın hücre büyümesini inhibe edebildiği bu çalışmada bir kez daha doğrulanmıştır. Bu bulgular, nanopartikül salım hızlarının optimize edilerek hem hücre göçü hem de invazyon üzerindeki etkilerin daha da güçlendirilebileceğini göstermektedir.

RA (rosmarinik asit) ve RA yüklü nanopartiküllerin (RANP) apoptotik etkileri hem gen ekspresyon analizi hem de DAPI boyama yöntemi ile detaylı olarak değerlendirilmiştir. DAPI boyama analizlerinde, RANP'nin apoptotik hücre ölümünü serbest RA'ya kıyasla daha yoğun bir şekilde indüklediği doğrulanmıştır. Apoptotik hücrelerde kromatin yoğunlaşması ve çekirdek fragmentasyonu gibi morfolojik değişiklikler açıkça gözlenmiştir.

RANP ve serbest rosmarinik asit (RA) uygulamalarının glioblastoma hücrelerinde apoptotik süreçlere etkisi değerlendirildiğinde, RANP'nin apoptotik mekanizmaları daha güçlü bir şekilde aktive ettiği açıkça görülmektedir. RANP uygulaması, Bax gen ekspresyonunu 18,52 kat artırırken, Bcl-2 ekspresyonunda 13,92 katlık bir artış sağlamış ve Bax/Bcl-2 oranını 1,33 seviyesine yükselterek apoptotik sürecin lehine güçlü bir denge oluşturmuştur. Ayrıca, sitokrom c seviyesinin 6,02 kat artışı,

RANP'nin mitokondriyal yolağı etkili bir şekilde tetiklediğini ve apoptozun güçlü bir şekilde indüklendiğini göstermektedir. Buna karşılık, serbest RA uygulamasında Bax gen ekspresyonunda yalnızca 1,64 kat, Bcl-2'de ise 6,05 katlık bir artış gözlenmiş, bu da Bax/Bcl-2 oranının 0,27'de kalmasına ve apoptotik sürecin baskılanmasına neden olmuştur. Serbest RA, sitokrom c seviyesinde 2,1 kat artış sağlayarak apoptotik mekanizmayı tamamen devre dışı bırakmasa da, sınırlı etkisi nedeniyle apoptotik yolağı yeterince aktive edememiştir. Bu veriler, RANP'nin biyoyararlanımı artırarak hem Bax/Bcl-2 dengesini apoptotik süreç lehine değiştirdiğini hem de sitokrom c salınımını güçlü bir şekilde artırarak mitokondriyal yolağı aktive ettiğini göstermektedir. Sonuç olarak, RANP formülasyonunun serbest RA'ya kıyasla glioblastoma hücrelerinde daha etkin bir antikanser ajan olduğu ve apoptotik mekanizmaları tetikleyerek tedavi potansiyelini önemli ölçüde artırdığı anlaşılmaktadır.

Ancak, Kaspaz ekspresyon seviyelerine dayanarak yapılan değerlendirme, kaspaz-3 ve kaspaz-9 gibi efektör genlerde belirgin bir değişiklik gözlenmemesi, apoptotik sürecin erken evrelerinde bulunulduğunu veya kaspaz-bağımsız alternatif mekanizmaların devrede olabileceğini işaret eder. Sitokrom-c gen ekspresyonundaki 6,025 kat artış, intrinsik yolun etkinleştiğini destekleyen önemli bir bulgudur, ancak sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınımı ve kaspaz aktivasyonunun deneysel olarak doğrulanması, bu mekanizmanın kesinliğini güçlendirebilir [181], [182]. Yani, kaspaz-3 ve kaspaz-9 gen ekspresyon seviyelerinde belirgin bir değişim gözlenmemesi, bu yolaktaki aktivasyonun henüz erken aşamalarda olabileceğini düşündürmektedir. Kaspaz-8 ekspresyon seviyelerinde ise anlamlı bir değişim saptanmamış, bu durum apoptotik sürecin ekstrinsik yola bağlı olmadığını desteklemiştir [183]. RANP'nin glioblastoma hücrelerinde apoptozu indüklemeye mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için ileri deneysel araştırmalara ihtiyaç vardır. Öncelikle, kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 gibi kritik apoptotik proteinlerin ekspresyon seviyelerinin protein düzeyinde Western blot veya ELISA gibi yöntemlerle doğrulanması önemlidir. Ayrıca, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) yöntemi kullanılarak DNA parçalanmasının varlığı ve apoptozun hücresel düzeyde görsel olarak doğrulanması değerlendirilebilir. Mitokondriyal membran

potansiyelindeki değişikliklerin JC-1 boyası veya benzeri floresan problemlerle incelenmesi, mitokondriyal yolak üzerindeki etkinin doğrulanması RANP'nin glioblastoma tedavisindeki potansiyelini anlamak ve bu doğrultuda ileri araştırmalar için bir temel oluşturmak adına önemli bir adım olacaktır.

Sonuç olarak, RANP'nin serbest RA'ya kıyasla glioblastoma hücrelerinde daha etkin bir apoptotik etki gösterdiği ve bu etkinin özellikle mitokondriyal (intrinsik) apoptotik yollar üzerinden gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu bulgular, RANP'nin kanser hücrelerinde apoptozu destekleyerek terapötik potansiyele sahip bir ajan olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışma, RA ve RANP'nin glioblastoma hücreleri üzerinde sitotoksikite, hücre göçünü baskılama ve apoptoz indüksiyonu gibi çok yönlü anti-kanser etkilerini ortaya koymuştur. RA yüklü nanopartiküllerin kontrollü salım ve hedefleme avantajları sayesinde glioblastoma tedavisinde umut verici bir terapötik ajan olabileceği düşünülmektedir. Gelecekte, salım kinetiklerinin optimize edilmesi RANP'nin terapötik potansiyelini daha da artırabilir. Özellikle glioblastoma tedavisinde nanopartikül bazlı ilaç taşıma sistemlerinin kullanılması, geleneksel tedavi yöntemlerine kıyasla daha hedefli ve etkili bir yaklaşım sunabilir.

Bu çalışma, RA yüklü PLGA nanopartiküllerin glioblastoma tedavisinde umut vadeden bir strateji sunduğunu göstermekle birlikte, gelecekteki çalışmalar için yol gösterici olabileceği düşünülmektedir. Bu nanopartiküller, insan glioblastoma tedavisinde etkili ve çok işlevli bir yaklaşımın temelini oluşturabilir. Geleneksel tedavi yöntemlerinin ötesinde etkili bir anti-kanser strateji olarak geliştirilmeye uygundur. RANP' nin U87MG insan glioblastoma hücreleri üzerindeki moleküler etkilerini daha iyi anlamak için, apoptozun içsel ve dışsal yolağındaki değişikliklerin protein düzeyinde incelenmesi, gen düzeyinde elde edilen bulguların teyit edilmesini ve bu bulguların doğruluğunun desteklenmesini sağlayacaktır. Ayrıca, *in vitro* bulguların klinik açıdan doğrulanabilmesi için, nanopartiküllerin biyoyumumluluğunu ve toksisitesini değerlendirmek amacıyla hayvan modelleri üzerinde kapsamlı deneyler yapılması önerilmektedir.

Sonuç olarak, RANP, glioblastoma gibi invazif kanser türlerinin tedavisinde umut vadeden bir ilaç taşıma sistemi olarak öne çıkmaktadır.

KAYNAKÇA

- [1] R. A. Weinberg, *The Biology of Cancer*, Garland Science., vol. 2nd. W.W. Norton & Company, 2013. doi: 10.1201/9780429258794.
- [2] F. Hanif, K. Muzaffar, K. Perveen, S. M. Malhi, and S. U. Simjee, “Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment,” *Asian Pac J Cancer Prev*, vol. 18, no. 1, p. 3, 2017, doi: 10.22034/APJCP.2017.18.1.3.
- [3] D. N. Louis *et al.*, “The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary,” *Acta Neuropathol*, vol. 131, no. 6, pp. 803–820, Jun. 2016, doi: 10.1007/S00401-016-1545-1/TABLES/5.
- [4] K. Rock *et al.*, “A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme--the validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: has a more radical approach improved survival?,” *Br J Radiol*, vol. 85, no. 1017, Sep. 2012, doi: 10.1259/BJR/83796755.
- [5] M. Weller *et al.*, “EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma,” *Lancet Oncol*, vol. 15, no. 9, 2014, doi: 10.1016/S1470-2045(14)70011-7.
- [6] M. Weller *et al.*, “Author Correction: EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood,” *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 19, no. 5, pp. 357–358, May 2022, doi: 10.1038/S41571-022-00623-3.
- [7] R. Daneman and A. Prat, “The Blood–Brain Barrier,” *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 7, no. 1, p. a020412, Jan. 2015, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A020412.
- [8] A. Vartanian *et al.*, “GBM’s multifaceted landscape: highlighting regional and microenvironmental heterogeneity,” *Neuro Oncol*, vol. 16, no. 9, pp. 1167–1175, 2014, doi: 10.1093/NEUONC/NOU035.
- [9] R. K. Oberoi, K. E. Parrish, T. T. Sio, R. K. Mittapalli, W. F. Elmquist, and J. N. Sarkaria, “Strategies to improve delivery of anticancer drugs across the blood–brain barrier to treat glioblastoma,” *Neuro Oncol*, vol. 18, no. 1, pp. 27–36, Jan. 2016, doi: 10.1093/NEUONC/NOV164.
- [10] H. Slika *et al.*, “Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms,” *Biomed Pharmacother*, vol. 146, p. 112442, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.biopha.2021.112442.
- [11] Q. Wang, H. Wang, Y. Jia, H. Pan, and H. Ding, “Luteolin induces apoptosis by ROS/ER stress and mitochondrial dysfunction in gliomablastoma,” *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 79, no. 5, pp. 1031–1041, May 2017, doi: 10.1007/S00280-017-3299-4.

- [12] C. B. Rajashekar and C. B. Rajashekar, "Dual Role of Plant Phenolic Compounds as Antioxidants and Prooxidants," *Am J Plant Sci*, vol. 14, no. 1, pp. 15–28, Jan. 2023, doi: 10.4236/AJPS.2023.141002.
- [13] C. H. Peng *et al.*, "Supercritical Fluid Extracts of Rosemary Leaves Exhibit Potent Anti-Inflammation and Anti-Tumor Effects," *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 71, no. 9, pp. 2223–2232, Sep. 2007, doi: 10.1271/BBB.70199.
- [14] S. Noor *et al.*, "Biomedical features and therapeutic potential of rosmarinic acid," *Archives of Pharmacal Research* 2022 45:4, vol. 45, no. 4, pp. 205–228, Apr. 2022, doi: 10.1007/S12272-022-01378-2.
- [15] K. Ramanauskienė, R. Raudonis, and D. Majiene, "Rosmarinic Acid and Melissa officinalis Extracts Differently Affect Glioblastoma Cells.," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2016, p. 1564257, 2016, doi: 10.1155/2016/1564257.
- [16] Y. Liu, X. Xu, H. Tang, Y. Pan, B. Hu, and G. Huang, "Rosmarinic acid inhibits cell proliferation, migration, and invasion and induces apoptosis in human glioma cells," *Int J Mol Med*, vol. 47, no. 5, p. 67, Feb. 2021, doi: 10.3892/ijmm.2021.4900.
- [17] S. Hossain *et al.*, "Rosmarinic acid: A review of its anticancer action," 2014. [Online]. Available: www.wjpps.com
- [18] C. P. R. Xavier, C. F. Lima, M. Fernandes-Ferreira, and C. Pereira-Wilson, "Salvia fruticosa, Salvia officinalis, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway.," *Nutr Cancer*, vol. 61, no. 4, pp. 564–71, 2009, doi: 10.1080/01635580802710733.
- [19] M. Alcaraz, M. Alcaraz-Saura, D. G. Achel, A. Olivares, J. A. López-Morata, and J. Castillo, "Radiosensitizing effect of rosmarinic acid in metastatic melanoma B16F10 cells.," *Anticancer Res*, vol. 34, no. 4, pp. 1913–21, Apr. 2014.
- [20] R. Sharmila and S. Manoharan, "Anti-tumor activity of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice.," *Indian J Exp Biol*, vol. 50, no. 3, pp. 187–94, Mar. 2012.
- [21] L. Tao *et al.*, "Phenolcarboxylic acids from medicinal herbs exert anticancer effects through disruption of COX-2 activity.," *Phytomedicine*, vol. 21, no. 11, pp. 1473–82, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.phymed.2014.05.001.
- [22] C.-S. Lin, C.-L. Kuo, J.-P. Wang, J.-S. Cheng, Z.-W. Huang, and C.-F. Chen, "Growth inhibitory and apoptosis inducing effect of Perilla frutescens extract on human hepatoma HepG2 cells.," *J Ethnopharmacol*, vol. 112, no. 3, pp. 557–67, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.jep.2007.05.008.
- [23] J. Paluszczak, V. Krajka-Kuźniak, and W. Baer-Dubowska, "The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells.," *Toxicol Lett*, vol. 192, no. 2, pp. 119–25, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.toxlet.2009.10.010.
- [24] A. Şengelen and E. Önay-Uçar, "Rosmarinic acid and siRNA combined therapy represses Hsp27 (HSPB1) expression and induces apoptosis in human glioma cells.," *Cell Stress Chaperones*, vol. 23, no. 5, pp. 885–896, Sep. 2018, doi: 10.1007/s12192-018-0896-z.
- [25] Y. Liu, X. Xu, H. Tang, Y. Pan, B. Hu, and G. Huang, "Rosmarinic acid inhibits cell proliferation, migration, and invasion and induces apoptosis in

- human glioma cells.," *Int J Mol Med*, vol. 47, no. 5, May 2021, doi: 10.3892/ijmm.2021.4900.
- [26] K. Wang, R. Shen, T. Meng, F. Hu, and H. Yuan, "Nano-Drug Delivery Systems Based on Different Targeting Mechanisms in the Targeted Therapy of Colorectal Cancer.," *Molecules*, vol. 27, no. 9, May 2022, doi: 10.3390/molecules27092981.
- [27] M. Hitl, N. Kladar, N. Gavarić, and B. Božin, "Rosmarinic Acid–Human Pharmacokinetics and Health Benefits," *Planta Med*, vol. 87, no. 04, pp. 273–282, Apr. 2021, doi: 10.1055/a-1301-8648.
- [28] Ayla Zırh Gürsoy, *Nanofsrmasötikler ve Uygulamaları*. İstanbul: İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, 2014.
- [29] L. Mo, L. Hou, D. Guo, X. Xiao, P. Mao, and X. Yang, "Preparation and characterization of teniposide PLGA nanoparticles and their uptake in human glioblastoma U87MG cells.," *Int J Pharm*, vol. 436, no. 1–2, pp. 815–24, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.07.050.
- [30] I. N. Najar and S. Das, "POLY-GLUTAMIC ACID (PGA)-STRUCTURE, SYNTHESIS, GENOMIC ORGANIZATION AND ITS APPLICATION: A REVIEW," *Int J Pharm Sci Res*, vol. 6, no. 6, pp. 2258–2280, 2015, doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(6).2258-80.
- [31] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems.," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
- [32] S. I. Hajdu, "A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1.," *Cancer*, vol. 117, no. 5, pp. 1097–1102, Mar. 2011, doi: 10.1002/CNCR.25553.
- [33] F. Martínez-Jiménez *et al.*, "A compendium of mutational cancer driver genes.," *Nat Rev Cancer*, vol. 20, no. 10, pp. 555–572, Oct. 2020, doi: 10.1038/s41568-020-0290-x.
- [34] J. O. Armitage, M. B. Kastan, J. H. Doroshow, and J. E. Tepper, "Abeloff's Clinical Oncology E-Book," 2020.
- [35] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer.," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, Jan. 2000, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- [36] J. Cassidy, D. Bissett, Roy A. J. Spence OBE, M. Payne, and Gareth Morris-Stiff, *Oxford Handbook of oncology Fourth edition*, , Fourth. UK: Oxford University Press, 2015.
- [37] S. Chakraborty and T. Rahman, "The difficulties in cancer treatment.," *Ecancermedicalsecience*, 2012, doi: 10.3332/ECANCER.2012.ED16.
- [38] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of Cancer: The Next Generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011, doi: 10.1016/J.CELL.2011.02.013.
- [39] D. Hanahan, "Hallmarks of Cancer: New Dimensions," *Cancer Discov*, vol. 12, no. 1, pp. 31–46, Jan. 2022, doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- [40] M. B. Kastan and J. Bartek, "Cell-cycle checkpoints and cancer.," *Nature*, vol. 432, no. 7015, pp. 316–23, Nov. 2004, doi: 10.1038/nature03097.
- [41] J. J. Blow and A. Dutta, "Preventing re-replication of chromosomal DNA.," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 6, no. 6, pp. 476–86, Jun. 2005, doi: 10.1038/nrm1663.
- [42] A. B. Pardee, "G1 events and regulation of cell proliferation.," *Science*, vol.

- 246, no. 4930, pp. 603–8, Nov. 1989, doi: 10.1126/science.2683075.
- [43] M. Ersoz *et al.*, “Comparative evaluation of hesperetin loaded nanoparticles for anticancer activity against C6 glioma cancer cells,” *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 47, no. 1, pp. 319–329, Dec. 2019, doi: 10.1080/21691401.2018.1556213.
 - [44] P. Nurse, “Ordering S phase and M phase in the cell cycle.,” *Cell*, vol. 79, no. 4, pp. 547–50, Nov. 1994, doi: 10.1016/0092-8674(94)90539-8.
 - [45] J. B. Reece, L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky, and R. B. Jackson, *Campbell Biology*, 9th ed. Boston: Pearson Education, 2011. Accessed: Jan. 28, 2025. [Online]. Available: https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=5t6aBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Campbell+biology,+Boston:+Pearson,+Boston:+Pearson,+2014,&ots=usd24gG9IJ&sig=MW9GrRixXxqzSHHYLlKzr0AZos8&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
 - [46] G. I. Shapiro, “Cyclin-Dependent Kinase Pathways As Targets for Cancer Treatment,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 24, no. 11, pp. 1770–1783, Apr. 2006, doi: 10.1200/JCO.2005.03.7689.
 - [47] K. J. Barnum and M. J. O’Connell, “Cell cycle regulation by checkpoints.,” *Methods Mol Biol*, vol. 1170, pp. 29–40, 2014, doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2_2.
 - [48] T. Abbas and A. Dutta, “p21 in cancer: intricate networks and multiple activities.,” *Nat Rev Cancer*, vol. 9, no. 6, pp. 400–14, Jun. 2009, doi: 10.1038/nrc2657.
 - [49] R. Hoshida and R. Jandial, “2016 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors: An Era of Molecular Biology,” *World Neurosurg*, vol. 94, pp. 561–562, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.WNEU.2016.07.082.
 - [50] C. McNamara *et al.*, “2021 WHO classification of tumours of the central nervous system: a review for the neuroradiologist,” *Neuroradiology*, vol. 64, no. 10, pp. 1919–1950, Oct. 2022, doi: 10.1007/s00234-022-03008-6.
 - [51] Cancer Genome Atlas Research Network, “Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways.,” *Nature*, vol. 455, no. 7216, pp. 1061–8, Oct. 2008, doi: 10.1038/nature07385.
 - [52] S. De Vleeschouwer, *Glioblastoma*. Australia: Codon Publications, 2017. doi: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.
 - [53] M. A. Morrison and J. M. Lupo, “7-T Magnetic Resonance Imaging in the Management of Brain Tumors.,” *Magn Reson Imaging Clin N Am*, vol. 29, no. 1, pp. 83–102, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.mric.2020.09.007.
 - [54] U. Pichlmeier, A. Bink, G. Schackert, W. Stummer, and ALA Glioma Study Group, “Resection and survival in glioblastoma multiforme: an RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients.,” *Neuro Oncol*, vol. 10, no. 6, pp. 1025–34, Dec. 2008, doi: 10.1215/15228517-2008-052.
 - [55] G. Iacob and E. B. Dinca, “Current data and strategy in glioblastoma multiforme.,” *J Med Life*, vol. 2, no. 4, pp. 386–93, 2009.
 - [56] M. Lacroix *et al.*, “A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival.,” *J Neurosurg*, vol. 95, no. 2, pp. 190–8, Aug. 2001, doi: 10.3171/jns.2001.95.2.0190.

- [57] R. Stupp *et al.*, “Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma,” *N Engl J Med*, vol. 352, no. 10, pp. 987–96, Mar. 2005, doi: 10.1056/NEJMoa043330.
- [58] T. Kayama, T. Yoshimoto, S. Fujimoto, and Y. Sakurai, “Intratumoral oxygen pressure in malignant brain tumor,” *J Neurosurg*, vol. 74, no. 1, pp. 55–59, Jan. 1991, doi: 10.3171/jns.1991.74.1.0055.
- [59] W. Wu *et al.*, “Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance,” *Pharmacol Res*, vol. 171, p. 105780, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.phrs.2021.105780.
- [60] H. Hatanaka, “Experience of boron-neutron capture therapy for malignant brain tumours--with special reference to the problems of postoperative CT follow-ups,” *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, vol. 42, pp. 187–92, 1988, doi: 10.1007/978-3-7091-8975-7_37.
- [61] M. Westphal *et al.*, “A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma,” *Neuro Oncol*, vol. 5, no. 2, pp. 79–88, Apr. 2003, doi: 10.1093/neuonc/5.2.79.
- [62] A. T. Parsa *et al.*, “Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma,” *Nat Med*, vol. 13, no. 1, pp. 84–8, Jan. 2007, doi: 10.1038/nm1517.
- [63] N. J. Abbott, L. Rönnbäck, and E. Hansson, “Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier,” *Nat Rev Neurosci*, vol. 7, no. 1, pp. 41–53, Jan. 2006, doi: 10.1038/nrn1824.
- [64] A. J. León-González, C. Auger, and V. B. Schini-Kerth, “Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy,” *Biochem Pharmacol*, vol. 98, no. 3, pp. 371–80, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.bcp.2015.07.017.
- [65] A. I. O. Jideani, H. Silungwe, T. Takalani, A. O. Omolola, H. O. Udeh, and T. A. Anyasi, “Antioxidant-rich natural fruit and vegetable products and human health,” *Int J Food Prop*, vol. 24, no. 1, pp. 41–67, Jan. 2021, doi: 10.1080/10942912.2020.1866597.
- [66] C. B. Rajashekar, • Edward E Carey, • Xin Zhao, and M.-M. Oh, “Health-Promoting Phytochemicals in Fruits and Vegetables: Impact of Abiotic Stresses and Crop Production Practices,” *Funct Plant Sci Biotechnol*, 2009.
- [67] D. F. Romagnolo and O. I. Selmin, “Flavonoids and Cancer Prevention: A Review of the Evidence,” *J Nutr Gerontol Geriatr*, vol. 31, no. 3, pp. 206–238, Jul. 2012, doi: 10.1080/21551197.2012.702534.
- [68] K. Brusselmans, R. Vrolix, G. Verhoeven, and J. V. Swinnen, “Induction of Cancer Cell Apoptosis by Flavonoids Is Associated with Their Ability to Inhibit Fatty Acid Synthase Activity,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 7, pp. 5636–5645, Feb. 2005, doi: 10.1074/JBC.M408177200.
- [69] E. Khatoun *et al.*, “Phytochemicals in cancer cell chemosensitization: Current knowledge and future perspectives,” *Semin Cancer Biol*, vol. 80, pp. 306–339, May 2022, doi: 10.1016/j.semcancer.2020.06.014.
- [70] M. M. Mostafa, M. M. Amin, M. Y. Zakaria, M. A. Hussein, M. M. Shamaa, and S. M. Abd El-Halim, “Chitosan Surface-Modified PLGA Nanoparticles Loaded with Cranberry Powder Extract as a Potential Oral Delivery Platform for Targeting Colon Cancer Cells,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 2, p. 606,

- Feb. 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15020606.
- [71] K. A. Scheckel, S. C. Degner, and D. F. Romagnolo, "Rosmarinic Acid Antagonizes Activator Protein-1–Dependent Activation of Cyclooxygenase-2 Expression in Human Cancer and Nonmalignant Cell Lines," *J Nutr*, vol. 138, no. 11, pp. 2098–2105, Nov. 2008, doi: 10.3945/JN.108.090431.
 - [72] J. Rocha *et al.*, "Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation.," *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, vol. 116, no. 5, pp. 398–413, May 2015, doi: 10.1111/bcpt.12335.
 - [73] N. A. Kelsey, H. M. Wilkins, and D. A. Linseman, "Nutraceutical Antioxidants as Novel Neuroprotective Agents," *Molecules*, vol. 15, no. 11, pp. 7792–7814, Nov. 2010, doi: 10.3390/molecules15117792.
 - [74] S. Noor *et al.*, "Biomedical features and therapeutic potential of rosmarinic acid," Apr. 01, 2022, *Pharmaceutical Society of Korea*. doi: 10.1007/s12272-022-01378-2.
 - [75] C. F. Wu, C. Hong, S. M. Klauck, Y. L. Lin, and T. Efferth, "Molecular mechanisms of rosmarinic acid from *Salvia miltiorrhiza* in acute lymphoblastic leukemia cells," *J Ethnopharmacol*, vol. 176, pp. 55–68, Dec. 2015, doi: 10.1016/J.JEP.2015.10.020.
 - [76] O. Yesil-Celiktas, C. Sevimli, E. Bedir, and F. Vardar-Sukan, "Inhibitory Effects of Rosemary Extracts, Carnosic Acid and Rosmarinic Acid on the Growth of Various Human Cancer Cell Lines," *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 65, no. 2, pp. 158–163, Jun. 2010, doi: 10.1007/s11130-010-0166-4.
 - [77] J. Paluszczak, V. Krajka-Kuźniak, and W. Baer-Dubowska, "The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells," *Toxicol Lett*, vol. 192, no. 2, pp. 119–125, Feb. 2010, doi: 10.1016/J.TOXLET.2009.10.010.
 - [78] K. A. Scheckel, S. C. Degner, and D. F. Romagnolo, "Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines.," *J Nutr*, vol. 138, no. 11, pp. 2098–105, Nov. 2008, doi: 10.3945/jn.108.090431.
 - [79] X. Chu *et al.*, "Effects of a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, rosmarinic acid, on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice.," *Molecules*, vol. 17, no. 3, pp. 3586–98, Mar. 2012, doi: 10.3390/molecules17033586.
 - [80] Y. Xu *et al.*, "Anti-Warburg effect of rosmarinic acid via miR-155 in colorectal carcinoma cells," *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 25, no. 6, pp. 481–489, 2016, doi: 10.2307/48504568.
 - [81] L. Huang, J. Chen, J. Quan, and D. Xiang, "Rosmarinic acid inhibits proliferation and migration, promotes apoptosis and enhances cisplatin sensitivity of melanoma cells through inhibiting ADAM17/EGFR/AKT/GSK3 β axis," *Bioengineered*, vol. 12, no. 1, pp. 3065–3076, Jan. 2021, doi: 10.1080/21655979.2021.1941699.
 - [82] Y. Liu, X. Xu, H. Tang, Y. Pan, B. Hu, and G. Huang, "Rosmarinic acid inhibits cell proliferation, migration, and invasion and induces apoptosis in human glioma cells," *Int J Mol Med*, vol. 47, no. 5, p. 67, Feb. 2021, doi: 10.3892/ijmm.2021.4900.
 - [83] A. Rodríguez-Luna, J. Ávila-Román, H. Oliveira, V. Motilva, and E. Talero,

- “Fucoxanthin and Rosmarinic Acid Combination Has Anti-Inflammatory Effects through Regulation of NLRP3 Inflammasome in UVB-Exposed HaCaT Keratinocytes,” *Mar Drugs*, vol. 17, no. 8, p. 451, Aug. 2019, doi: 10.3390/md17080451.
- [84] S. Anwar *et al.*, “Rosmarinic Acid Exhibits Anticancer Effects via MARK4 Inhibition,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, p. 10300, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-65648-z.
- [85] C. S. Lin, C. L. Kuo, J. P. Wang, J. S. Cheng, Z. W. Huang, and C. F. Chen, “Growth inhibitory and apoptosis inducing effect of *Perilla frutescens* extract on human hepatoma HepG2 cells,” *J Ethnopharmacol*, vol. 112, no. 3, pp. 557–567, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.jep.2007.05.008.
- [86] R. Jose Varghese, E. H. M. Sakho, S. Parani, S. Thomas, O. S. Oluwafemi, and J. Wu, “Introduction to nanomaterials: synthesis and applications,” *Nanomaterials for Solar Cell Applications*, pp. 75–95, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-813337-8.00003-5.
- [87] J. E. Hulla, S. C. Sahu, and A. W. Hayes, “Nanotechnology: History and future,” *Hum Exp Toxicol*, vol. 34, no. 12, pp. 1318–21, Dec. 2015, doi: 10.1177/0960327115603588.
- [88] S. Khizar *et al.*, “Nanocarriers based novel and effective drug delivery system,” *Int J Pharm*, vol. 632, p. 122570, Feb. 2023, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2022.122570.
- [89] M. Singh, V. Thakur, R. Deshmukh, and N. Mishra, “Role of Nanocarriers for Drug Delivery to Brain,” *Available online www.jocpr.com Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 10, no. 1, pp. 155–168, 2018, [Online]. Available: www.jocpr.com
- [90] H. Zou, Z. Wang, and M. Feng, “Nanocarriers with tunable surface properties to unblock bottlenecks in systemic drug and gene delivery,” *Journal of Controlled Release*, vol. 214, pp. 121–133, Sep. 2015, doi: 10.1016/J.JCONREL.2015.07.014.
- [91] T. M. Allen and P. R. Cullis, “Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 65, no. 1, pp. 36–48, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.037.
- [92] M. Das and L. Huang, “Liposomal Nanostructures for Drug Delivery in Gastrointestinal Cancers,” *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 370, no. 3, pp. 647–656, Sep. 2019, doi: 10.1124/JPET.118.254797.
- [93] E. Kipps, K. Young, and N. Starling, “Liposomal irinotecan in gemcitabine-refractory metastatic pancreatic cancer: efficacy, safety and place in therapy,” *Ther Adv Med Oncol*, vol. 9, no. 3, pp. 159–170, Mar. 2017, doi: 10.1177/1758834016688816.
- [94] B. Kwong, S. A. Gai, J. Elkhader, K. D. Wittrup, and D. J. Irvine, “Localized immunotherapy via liposome-anchored Anti-CD137 + IL-2 prevents lethal toxicity and elicits local and systemic antitumor immunity,” *Cancer Res*, vol. 73, no. 5, pp. 1547–58, Mar. 2013, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3343.
- [95] P. Zhang *et al.*, “Engineering the Surface of Smart Nanocarriers Using a pH-/Thermal-/GSH-Responsive Polymer Zipper for Precise Tumor Targeting Therapy In Vivo,” *Adv Mater*, vol. 29, no. 36, Sep. 2017, doi: 10.1002/adma.201702311.

- [96] N. Desai, "Challenges in Development of Nanoparticle-Based Therapeutics," *AAPS J*, vol. 14, no. 2, pp. 282–295, Jun. 2012, doi: 10.1208/s12248-012-9339-4.
- [97] Y. Barenholz, "Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned," *Journal of Controlled Release*, vol. 160, no. 2, pp. 117–134, Jun. 2012, doi: 10.1016/J.JCONREL.2012.03.020.
- [98] Hemant Kumar Yadav, "Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review," *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, no. 5, pp. 16–23, Jan. 2012, Accessed: Jan. 28, 2025. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/279545193_Different_techniques_for_preparation_of_polymeric_nanoparticles-_A_review
- [99] E. M. Elmowafy, M. Tiboni, and M. E. Soliman, "Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles," Jul. 01, 2019, *Springer Netherlands*. doi: 10.1007/s40005-019-00439-x.
- [100] R. Song, M. Murphy, C. Li, K. Ting, C. Soo, and Z. Zheng, "Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications," *Drug Des Devel Ther*, vol. Volume 12, pp. 3117–3145, Sep. 2018, doi: 10.2147/DDDT.S165440.
- [101] S. Derman, "Caffeic Acid Phenethyl Ester Loaded PLGA Nanoparticles: Effect of Various Process Parameters on Reaction Yield, Encapsulation Efficiency, and Particle Size," *J Nanomater*, vol. 2015, no. 1, Jan. 2015, doi: 10.1155/2015/341848.
- [102] P. Abasian, S. Ghanavati, S. Rahebi, S. Nouri Khorasani, and S. Khalili, "Polymeric nanocarriers in targeted drug delivery systems: A review," *Polym Adv Technol*, vol. 31, no. 12, pp. 2939–2954, Dec. 2020, doi: 10.1002/pat.5031.
- [103] J. Panyam and V. Labhasetwar, "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 55, no. 3, pp. 329–347, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0169-409X(02)00228-4.
- [104] H. K. Makadia and S. J. Siegel, "Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier," *Polymers (Basel)*, vol. 3, no. 3, pp. 1377–1397, Aug. 2011, doi: 10.3390/polym3031377.
- [105] S. Su and P. M. Kang, "Systemic Review of Biodegradable Nanomaterials in Nanomedicine," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 4, p. 656, Apr. 2020, doi: 10.3390/nano10040656.
- [106] B. A. Saeed, V. Lim, N. A. Yusof, K. Z. Khor, H. S. Rahman, and N. Abdul Samad, "Antiangiogenic properties of nanoparticles: a systematic review.," *Int J Nanomedicine*, vol. 14, pp. 5135–5146, 2019, doi: 10.2147/IJN.S199974.
- [107] C. Pathak, F. U. Vaidya, and S. M. Pandey, "Mechanism for Development of Nanobased Drug Delivery System," *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*, pp. 35–67, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-814029-1.00003-X.
- [108] S. Rezvantlab *et al.*, "PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment.," *Front Pharmacol*, vol. 9, p. 1260, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01260.
- [109] R. A. Jain, "The manufacturing techniques of various drug loaded

- biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 23, pp. 2475–2490, Dec. 2000, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00115-0.
- [110] H. K. Makadia and S. J. Siegel, “Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier,” *Polymers (Basel)*, vol. 3, no. 3, pp. 1377–1397, Aug. 2011, doi: 10.3390/polym3031377.
 - [111] K.-T. Kim, J.-Y. Lee, D.-D. Kim, I.-S. Yoon, and H.-J. Cho, “Recent Progress in the Development of Poly(lactic-co-glycolic acid)-Based Nanostructures for Cancer Imaging and Therapy,” *Pharmaceutics*, vol. 11, no. 6, Jun. 2019, doi: 10.3390/pharmaceutics11060280.
 - [112] S. Su and P. M. Kang, “Systemic Review of Biodegradable Nanomaterials in Nanomedicine,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 4, p. 656, Apr. 2020, doi: 10.3390/nano10040656.
 - [113] F. S. Tabatabaei Mirakabad *et al.*, “PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems,” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 15, no. 2, pp. 517–535, Jan. 2014, doi: 10.7314/APJCP.2014.15.2.517.
 - [114] V. P. Torchilin, *Nanoparticulates as Drug Carriers*. PUBLISHED BY IMPERIAL COLLEGE PRESS AND DISTRIBUTED BY WORLD SCIENTIFIC PUBLISHING CO., 2006. doi: 10.1142/p432.
 - [115] C. Caro, A. Avasthi, J. M. Paez-Muñoz, M. Pernia Leal, and M. L. García-Martín, “Passive targeting of high-grade gliomas via the EPR effect: a closed path for metallic nanoparticles?,” *Biomater Sci*, vol. 9, no. 23, pp. 7984–7995, 2021, doi: 10.1039/D1BM01398J.
 - [116] A. Yusuf, A. R. Z. Almotairy, H. Henidi, O. Y. Alshehri, and M. S. Aldughaim, “Nanoparticles as Drug Delivery Systems: A Review of the Implication of Nanoparticles’ Physicochemical Properties on Responses in Biological Systems,” *Polymers (Basel)*, vol. 15, no. 7, p. 1596, Mar. 2023, doi: 10.3390/polym15071596.
 - [117] J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, and L. M. Ensign, “PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 99, no. Pt A, pp. 28–51, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.09.012.
 - [118] J. Wu, “The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application,” *J Pers Med*, vol. 11, no. 8, Aug. 2021, doi: 10.3390/jpm11080771.
 - [119] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, and O. C. Farokhzad, “Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 66, pp. 2–25, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.addr.2013.11.009.
 - [120] D. Rosenblum, N. Joshi, W. Tao, J. M. Karp, and D. Peer, “Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics,” *Nat Commun*, vol. 9, no. 1, p. 1410, Apr. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03705-y.
 - [121] R. K. Jain and T. Stylianopoulos, “Delivering nanomedicine to solid tumors,” *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 7, no. 11, pp. 653–64, Nov. 2010, doi: 10.1038/nrclinonc.2010.139.
 - [122] Y. Dang and J. Guan, “Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy,” *Smart Mater Med*, vol. 1, pp. 10–19, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.SMAIM.2020.04.001.

- [123] P. N. Navya, A. Kaphle, S. P. Srinivas, S. K. Bhargava, V. M. Rotello, and H. K. Daima, "Current trends and challenges in cancer management and therapy using designer nanomaterials.," *Nano Converge*, vol. 6, no. 1, p. 23, Jul. 2019, doi: 10.1186/s40580-019-0193-2.
- [124] A. A. Thorat and R. Suryanarayanan, "Characterization of Phosphate Buffered Saline (PBS) in Frozen State and after Freeze-Drying," *Pharm Res*, vol. 36, no. 7, p. 98, Jul. 2019, doi: 10.1007/s11095-019-2619-2.
- [125] D. Brooke, N. Movahed, and B. Bothner, "Universal buffers for use in biochemistry and biophysical experiments.," *AIMS Biophys*, vol. 2, no. 3, pp. 336–342, 2015, doi: 10.3934/biophy.2015.3.336.
- [126] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*. Thomson Brooks/Cole, 2007. Accessed: Jan. 28, 2025. [Online]. Available: <https://books.google.com.tr/books?id=GrOsQgAACAAJ>
- [127] S. M. Vilas-Boas *et al.*, "Solubility and solid phase studies of isomeric phenolic acids in pure solvents," *J Mol Liq*, vol. 272, pp. 1048–1057, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.molliq.2018.10.108.
- [128] J. García-Melero, J.-J. López-Mitjavila, M. J. García-Celma, C. Rodríguez-Abreu, and S. Grijalvo, "Rosmarinic Acid-Loaded Polymeric Nanoparticles Prepared by Low-Energy Nano-Emulsion Templating: Formulation, Biophysical Characterization, and In Vitro Studies.," *Materials (Basel)*, vol. 15, no. 13, Jun. 2022, doi: 10.3390/ma15134572.
- [129] C. Pinto Reis, R. J. Neufeld, , António J. Ribeiro, and F. Veiga, "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles," *Nanomedicine*, vol. 2, no. 1, pp. 8–21, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.nano.2005.12.003.
- [130] F. S. Poyraz, R. D. Colpan, S. Derman, B. Mansuroglu, and A. Erdemir, "Investigation of cellular and molecular mechanisms of caffeic acid phenethyl ester loaded nanoparticle systems in breast cancer cell lines," *Process Biochemistry*, vol. 134, pp. 32–43, Nov. 2023, doi: 10.1016/J.PROCBIO.2023.09.016.
- [131] M. G. Nava-Arzaluz, E. Pinon-Segundo, A. Ganem-Rondero, and D. Lechuga-Ballesteros, "Single Emulsion-Solvent Evaporation Technique and Modifications for the Preparation of Pharmaceutical Polymeric Nanoparticles," *Recent Pat Drug Deliv Formul*, vol. 6, no. 3, pp. 209–223, Aug. 2012, doi: 10.2174/187221112802652633.
- [132] R. S. Dangi and S. Shakya, "Preparation, optimization and characterization of PLGA nanoparticle," *Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS)*, vol. 4, no. 7, pp. 2810–2818, 2013.
- [133] C. E. Astete and C. M. Sabliov, "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles," *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 17, no. 3, pp. 247–289, Jan. 2006, doi: 10.1163/156856206775997322.
- [134] K. A. Altammar, "A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges.," *Front Microbiol*, vol. 14, p. 1155622, 2023, doi: 10.3389/fmicb.2023.1155622.
- [135] M. Ersoz *et al.*, "Comparative evaluation of hesperetin loaded nanoparticles for anticancer activity against C6 glioma cancer cells," *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 47, no. 1, pp. 319–329, Dec. 2019, doi: 10.1080/21691401.2018.1556213.

- [136] J. Y. Teo *et al.*, “pH and redox dual-responsive biodegradable polymeric micelles with high drug loading for effective anticancer drug delivery.,” *Nanomedicine*, vol. 13, no. 2, pp. 431–442, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.nano.2016.09.016.
- [137] J. Siepmann, R. A. Siegel, and F. Siepmann, “Diffusion controlled drug delivery systems,” *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, pp. 127–152, Jan. 2012, doi: 10.1007/978-1-4614-0881-9_6/FIGURES/14_6.
- [138] K. A. Dunphy Guzman, M. P. Finnegan, and J. F. Banfield, “Influence of Surface Potential on Aggregation and Transport of Titania Nanoparticles,” *Environ Sci Technol*, vol. 40, no. 24, pp. 7688–7693, Dec. 2006, doi: 10.1021/es060847g.
- [139] F. R. van de Voort, “Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis,” *Food Research International*, vol. 25, no. 5, pp. 397–403, Jan. 1992, doi: 10.1016/0963-9969(92)90115-L.
- [140] B. C. Smith, *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. CRC Press, 2011. doi: 10.1201/b10777.
- [141] E. Suzuki, “High-resolution scanning electron microscopy of immunogold-labelled cells by the use of thin plasma coating of osmium.,” *J Microsc*, vol. 208, no. Pt 3, pp. 153–7, Dec. 2002, doi: 10.1046/j.1365-2818.2002.01082.x.
- [142] J. Weng, H. H. Y. Tong, and S. F. Chow, “In Vitro Release Study of the Polymeric Drug Nanoparticles: Development and Validation of a Novel Method,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 8, p. 732, Aug. 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12080732.
- [143] “U-87 MG - HTB-14 | ATCC.” Accessed: Jan. 28, 2025. [Online]. Available: <https://www.atcc.org/products/htb-14>
- [144] Leslie. Wilson, P. T. . Matsudaira, J. P. . Mather, and David. Barnes, “Animal Cell Culture Methods,” in *Methods in Cell Biology*, vol. 57, Elsevier Science, 2014, p. 1.
- [145] B. Grobбен, P. P. De Deyn, and H. Slegers, “Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion.,” *Cell Tissue Res*, vol. 310, no. 3, pp. 257–70, Dec. 2002, doi: 10.1007/s00441-002-0651-7.
- [146] M. Allen, M. Bjerke, H. Edlund, S. Nelander, and B. Westermarck, “Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news.,” *Sci Transl Med*, vol. 8, no. 354, p. 354re3, Aug. 2016, doi: 10.1126/scitranslmed.aaf6853.
- [147] F. Piccinini, A. Tesei, C. Arienti, and A. Bevilacqua, “Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay,” *Biol Proced Online*, vol. 19, no. 1, p. 8, Dec. 2017, doi: 10.1186/s12575-017-0056-3.
- [148] S. Şahin, G. Tezcan, C. Demir, B. Tunca, G. Çeçener, and Ü. Egili, “CYTOTOXIC ACTIVITY OF ROSMARINIC ACID ISOLATED FROM *Prunella vulgaris* L. AND *Prunella grandiflora* L. IN DIFFERENT TUMOR CELLS,” *Trak Univ J Nat Sci*, Mar. 2017, doi: 10.23902/trkjnat.266524.
- [149] A. van Tonder, A. M. Joubert, and A. D. Cromarty, “Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays.,” *BMC Res Notes*, vol. 8, p. 47, Feb. 2015, doi: 10.1186/s13104-015-1000-8.

- [150] S. A. Eming, P. Martin, and M. Tomic-Canic, "Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation.," *Sci Transl Med*, vol. 6, no. 265, p. 265sr6, Dec. 2014, doi: 10.1126/scitranslmed.3009337.
- [151] H. G. Gratzner, "Monoclonal Antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine: A New Reagent for Detection of DNA Replication," *Science* (1979), vol. 218, no. 4571, pp. 474–475, Oct. 1982, doi: 10.1126/science.7123245.
- [152] J. Sun *et al.*, "Microfluidic Cell Cycle Analysis of Spread Cells by DAPI Staining," *Micromachines (Basel)*, vol. 8, no. 2, p. 36, Jan. 2017, doi: 10.3390/mi8020036.
- [153] M. Ersoz *et al.*, "Comparative evaluation of hesperetin loaded nanoparticles for anticancer activity against C6 glioma cancer cells.," *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 47, no. 1, pp. 319–329, Dec. 2019, doi: 10.1080/21691401.2018.1556213.
- [154] P. Chomczynski and N. Sacchi, "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.," *Anal Biochem*, vol. 162, no. 1, pp. 156–9, Apr. 1987, doi: 10.1006/abio.1987.9999.
- [155] S. A. Bustin and T. Nolan, "Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.," *J Biomol Tech*, vol. 15, no. 3, pp. 155–66, Sep. 2004.
- [156] J. C. Reed, "Mechanisms of apoptosis.," *Am J Pathol*, vol. 157, no. 5, pp. 1415–30, Nov. 2000, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64779-7.
- [157] M. Raisova *et al.*, "The Bax/Bcl-2 Ratio Determines the Susceptibility of Human Melanoma Cells to CD95/Fas-Mediated Apoptosis," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 117, no. 2, pp. 333–340, Aug. 2001, doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01409.x.
- [158] M. L. Wong and J. F. Medrano, "Real-Time PCR for mRNA Quantitation," *Biotechniques*, vol. 39, no. 1, pp. 75–85, Jul. 2005, doi: 10.2144/05391RV01.
- [159] Zar. Jerrold H., *Biostatistical Analysis*, 5th ed. USA: Pearson Education., 2010.
- [160] K. Zhou and L. Yu, "Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 37, no. 7, pp. 717–721, Nov. 2004, doi: 10.1016/J.LWT.2004.02.008.
- [161] L. Calabrone, M. Larocca, S. Marzocco, G. Martelli, and R. Rossano, "Total Phenols and Flavonoids Content, Antioxidant Capacity and Lipase Inhibition of Root and Leaf Horseradish (<i>Armoracia rusticana<i>) Extracts," *Food Nutr Sci*, vol. 06, no. 01, pp. 64–74, 2015, doi: 10.4236/fns.2015.61008.
- [162] A. Gholipour Kanani and S. H. Bahrami, "Effect of Changing Solvents on Poly(-Caprolactone) Nanofibrous Webs Morphology," *J Nanomater*, vol. 2011, pp. 1–10, 2011, doi: 10.1155/2011/724153.
- [163] M. Halayqa and U. Domańska, "PLGA biodegradable nanoparticles containing perphenazine or chlorpromazine hydrochloride: effect of formulation and release.," *Int J Mol Sci*, vol. 15, no. 12, pp. 23909–23, Dec. 2014, doi: 10.3390/ijms151223909.
- [164] X. Song *et al.*, "PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine

- sulfate and verapamil hydrochloride: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency.,” *Int J Pharm*, vol. 350, no. 1–2, pp. 320–9, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.08.034.
- [165] W. Wan and J. T. W. Yeow, “The effects of gold nanoparticles with different sizes on polymerase chain reaction efficiency.,” *Nanotechnology*, vol. 20, no. 32, p. 325702, Aug. 2009, doi: 10.1088/0957-4484/20/32/325702.
- [166] P. Sriamornsak, J. Nunthanid, K. Cheewatanakornkool, and S. Manchun, “Effect of drug loading method on drug content and drug release from calcium pectinate gel beads.,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 11, no. 3, pp. 1315–9, Sep. 2010, doi: 10.1208/s12249-010-9513-x.
- [167] H. Ramezani Dana and F. Ebrahimi, “Synthesis, properties, and applications of polylactic acid-based polymers,” *Polym Eng Sci*, vol. 63, no. 1, pp. 22–43, Jan. 2023, doi: 10.1002/pen.26193.
- [168] J. M. Barichello, M. Morishita, K. Takayama, and T. Nagai, “Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method,” *Drug Dev Ind Pharm*, vol. 25, no. 4, pp. 471–476, Jan. 1999, doi: 10.1081/DDC-100102197.
- [169] D. S. Jain *et al.*, “Unraveling the cytotoxic potential of Temozolomide loaded into PLGA nanoparticles.,” *Daru*, vol. 22, no. 1, p. 18, Jan. 2014, doi: 10.1186/2008-2231-22-18.
- [170] G. Tiwari *et al.*, “Drug delivery systems: An updated review.,” *Int J Pharm Investig*, vol. 2, no. 1, pp. 2–11, Jan. 2012, doi: 10.4103/2230-973X.96920.
- [171] A. K. Jain and S. Thareja, “*In vitro* and *in vivo* characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery,” *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 47, no. 1, pp. 524–539, Dec. 2019, doi: 10.1080/21691401.2018.1561457.
- [172] S. Honary and F. Zahir, “Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1),” *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 2, May 2013, doi: 10.4314/tjpr.v12i2.19.
- [173] S. Mourdikoudis, R. M. Pallares, and N. T. K. Thanh, “Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties.,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 27, pp. 12871–12934, Jul. 2018, doi: 10.1039/c8nr02278j.
- [174] J. Carmichael, W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell, “Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing.,” *Cancer Res*, vol. 47, no. 4, pp. 936–42, Feb. 1987.
- [175] T. Mosmann, “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.,” *J Immunol Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, Dec. 1983, doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [176] D. Matias *et al.*, “Dual treatment with shikonin and temozolomide reduces glioblastoma tumor growth, migration and glial-to-mesenchymal transition.,” *Cellular oncology (Dordrecht, Netherlands)*, vol. 40, no. 3, pp. 247–261, Jun. 2017, doi: 10.1007/s13402-017-0320-1.
- [177] V. Roukos, G. Pegoraro, T. C. Voss, and T. Misteli, “Cell cycle staging of individual cells by fluorescence microscopy.,” *Nat Protoc*, vol. 10, no. 2, pp.

- 334–48, Feb. 2015, doi: 10.1038/nprot.2015.016.
- [178] G. I. Evan and K. H. Vousden, “Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.,” *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 342–8, May 2001, doi: 10.1038/35077213.
 - [179] S. Goldar, M. S. Khaniani, S. M. Derakhshan, and B. Baradaran, “Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment.,” *Asian Pac J Cancer Prev*, vol. 16, no. 6, pp. 2129–44, 2015, doi: 10.7314/apjcp.2015.16.6.2129.
 - [180] R. Jan and G.-E.-S. Chaudhry, “Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics.,” *Adv Pharm Bull*, vol. 9, no. 2, pp. 205–218, Jun. 2019, doi: 10.15171/apb.2019.024.
 - [181] J. Cai, J. Yang, and D. P. Jones, “Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1366, no. 1–2, pp. 139–149, Aug. 1998, doi: 10.1016/S0005-2728(98)00109-1.
 - [182] M. O. Ripple, M. Abajian, and R. Springett, “Cytochrome c is rapidly reduced in the cytosol after mitochondrial outer membrane permeabilization,” *Apoptosis*, vol. 15, no. 5, pp. 563–573, May 2010, doi: 10.1007/s10495-010-0455-2.
 - [183] P. Li *et al.*, “Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application.,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 14, pp. 23996–24008, Apr. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.15098.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

- [1] Z. Sercan and A. Erdemir, “Synthesis and characterization of rosmarinic acid-loaded PLGA nanoparticles for use in cancer treatment,” in *IMASCON 2024 Autumn International Marmara Science and Social Sciences Congress*, Nov. 2024, p. 36.

Projeler

- [2] Z. Sercan and A. Erdemir, “Glioblastoma tedavisinde kullanılmak üzere rosmarinik asit yüklü nanopartiküllerin sentezi, karakterizasyonu ve in vitro analizi,” BAP, Proje No. FYL-2024-6058, Yüksek Lisans Tezi, 2024.