



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALFA-13-KARBOKSİKROMANOLÜN NANOPARTİKÜL ARACILI
MAKROFAJA İLETİMİNİN *IN VITRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

EDA İLAYDA TALAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. AHMET ERDİ SÖZEN
BİYOKİMYA (TIP) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL- 2025



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALFA-13-KARBOKSİKROMANOLÜN NANOPARTİKÜL ARACILI
MAKROFAJA İLETİMİNİN *IN VITRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

EDA İLAYDA TALAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. AHMET ERDİ SÖZEN
BİYOKİMYA (TIP) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL- 2025

TEZ ONAY FORMU

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Eda İlayda Talaz

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, akademik rehberliklerinin yanı sıra her zaman manevi desteğini göstermekten çekinmeyen değerli danışmanım **Doç. Dr. Ahmet Erdi SÖZEN** ve bilgi birikimi, vizyonu ile akademik hayatta ilerlememi destekleyen saygıdeğer hocam **Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER** başta olmak üzere, bölümümüzün saygıdeğer hocaları **Prof. Dr. Goncağül HAKLAR**, **Prof. Dr. Önder ŞİRİKÇİ**, **Prof. Dr. Ahmet Süha YALÇIN**, **Doç. Dr. Saime BATIREL**, **Öğr. Gör. Dr. Ayşe Mine YILMAZ GÖLER**’e ve bölümümüz için her daim emek veren **Şenol YOLCU**’ya

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde geçirdiğim süre boyunca yardımlarını esirgemeyen **Bengü ÇETİNKAYA**’ya ve bu süreçte hem akademik hem de kişisel anlamda bir an olsun yanımda olmayı bırakmayan canım arkadaşlarım **Seher MEŞE TAYFUR** ve **İbrahim İSOT**’a

Tezimin hazırlanması sırasında cesaret veren, kıymetli yardımlarıyla varlıklarını daima hissettiğim sevgili arkadaşlarım **Onur Can GÜNDÜZ**, **Efe Buğra AÇIKALIN**’a ve bu sürecin tamamında beni bir an olsun yalnız bırakmayan her gün cesaretlendiren ve manevi desteğini asla esirgemeyen canım dostlarım **Mehmet Alp GÜNER** ve özellikle **Esra Bersun ERKAN**’a

Hayatım boyunca attığım her adımda, aldığım bütün kararlarda yanımda olan, varlıklarıyla bana güç veren kıymetli aileme; özellikle sevgili babam **Hüseyin TALAZ**, canım annem **Maviye TALAZ**, her koşulda arkamda duran en büyük desteğim sevgili ablam **Merve TALAZ** ve ışıgım, yoldaşım hem kardeşim hem arkadaşım **Nisa Nilay TALAZ**’a

Bu çalışmanın gerçekleşmesindeki mali desteği sağlayan **Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)**’a en içten teşekkürü büyük bir borç bilirim.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 1001 programı kapsamında “Makrofaj Hedefli Uzun Zincirli Vitamin E Metaboliti α -13'-COOH Yükl nmiř Nanopartiküllerin Hazırlanması ve *In Vitro* ve *In Vivo* Deney Modellerinde İncelenmesi” başlıklı, 121S687 proje numaralı araştırma tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ	i
ŞEKİL LİSTESİ	ii
TABLO LİSTESİ.....	iii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Vitamin E	5
4.1.1. Vitamin E ve taşınımı	5
4.1.2. Vitamin E ve metabolizması.....	6
4.2. İnflamasyon.....	10
4.2.1. İnflamasyon ve makrofajlar	10
4.2.2. İnflamasyon ve uzun zincirli vitamin E metabolitleri.....	14
4.3. İlaç Taşıma Sistemleri.....	16
4.3.1. Makrofaj hedefli nanopartiküller	16
5. GEREÇ ve YÖNTEM	18
5.1. Gereçler	18
5.1.1. Kimyasallar	18
5.1.2. Kitler	18
5.1.3. Sarf malzemeleri	19
5.1.4. Ekipmanlar.....	19
5.2. Yöntemler.....	20
5.2.1. Nanopartiküllerin hazırlanması.....	20
5.2.2. Fare kemik iliğinden türetilmiş makrofaj hücreleri eldesi.....	20
5.2.3. Nanopartikül maruziyeti ve deney gruplarının oluşturulması	21
5.2.4. MTT testi ile hücre canlılığının belirlenmesi.....	22
5.2.5. LC-MS/MS ile α -13'-COOH düzeyinin belirlenmesi	23
5.2.6. İnflamasyonla ilişkili sitokinlerin mRNA ekspresyonlarının belirlenmesi	24
5.2.6.1. RNA izolasyonu.....	24
5.2.6.2. Total RNA'dan cDNA sentezi	24

5.2.6.3. qRT-PCR deneyleri.....	25
5.2.7. Kullanılan istatistiksel yöntemler	25
6. BULGULAR	26
6.1. Farklılaşmış Makrofaj Hücrelerinin Akış Sitometrisi ile Doğrulanması	26
6.2. Nanopartikül Birikimi Sonuçları.....	26
6.3. Hücre Canlılığı Sonuçları.....	27
6.4. LC-MS/MS ile α -13'-COOH Düzeyi Sonuçları.....	28
6.5. İnflamasyonla İlişkili Sitokinlerin mRNA Ekspresyon Sonuçları	29
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	35
8. KAYNAKLAR.....	40
9. ÖZGEÇMİŞ	45
10. BİLİMSEL FAALİYETLER	46
11. EKLER	47
11.1. Etik Kurul Onay Formu	47

KISALTMALAR LİSTESİ

5-LOX	:	5-lipoksijenaz
13'-OH	:	13'-Hidroksikromanol
α -13'COOH	:	Alfa-13'-Karboksikromanol
α -TTP	:	Alfa-Tokoferol Transfer Proteini
AVED	:	Ataksi ile İlişkili Vitamin E Eksikliği
COX-1	:	Siklooksijenaz -1
COX-2	:	Siklooksijenaz -2
CRP	:	C- Reaktif Protein
FITC	:	Floresin İzotiyosiyanat
HPLC	:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IL-1 β	:	İnterlökin-1 Beta
IL-6	:	İnterlökin-6
IL-10	:	İnterlökin-10
İTS	:	İlaç Taşıma Sistemleri
JAK/STAT	:	Janus Kinaz/Transkripsiyon Sinyal Transdüseri ve Aktivatörü 3
LPS	:	Lipopolisakkarit
M1	:	Makrofaj 1
M2	:	Makrofaj 2
MS	:	Kütle Spektrometrisi
NF- κ B	:	Nükleer Faktör Kappa B
NP	:	Nanopartikül
PGE2	:	Prostaglandin E2
PLGA	:	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
TNF- α	:	Tümör Nekroz Alfa

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1.	Tokoferollerin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.	Tokotrienollerin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 3.	α -13'-COOH'ün kimyasal yapısı.....	10
Şekil 4.	Mononükleer fagositlerin olgunlaşması.....	11
Şekil 5.	Akut inflamatuvar yanıtın pro-inflamatuvar sitokin salınımına aracılık etmesi	13
Şekil 6.	Akım sitometrisi ile makrofaj farklılaşması sonuçları.....	26
Şekil 7.	Konfokal mikroskopunda NP birikimi sonuçlarının gözlemlenmesi.....	27
Şekil 8.	MTT testi ile elde edilen hücre canlılığı değerleri.....	28
Şekil 9.	α -13'-COOH düzeyinin LC- MS/MS ile değerlendirilmesi.....	29
Şekil 10.	TGF- β mRNA ekspresyonunun, qRT-PCR ile değerlendirilmesi.....	30
Şekil 11.	IL-1 β mRNA ekspresyonunun RT-PCR ile değerlendirilmesi.....	31
Şekil 12.	IL-6 mRNA ekspresyonunun RT-PCR ile değerlendirilmesi.....	32
Şekil 13.	IL-10 mRNA ekspresyonunun RT-PCR ile değerlendirilmesi.....	33
Şekil 14.	TNF- α mRNA ekspresyonunun RT-PCR ile değerlendirilmesi.....	34

TABLO LİSTESİ

Sayfa Numarası

Tablo 1.	Vitamin E'nin sınıflandırılması.....	8
Tablo 2.	MTT ve LC-MS/MS deney grupları.....	21
Tablo 3.	qRT-PCR deney grupları.....	22
Tablo 4.	Ekspresyonu saptanacak genlere ait primer dizileri.....	25

1. ÖZET

Tezin başlığı : Alfa-13-Karboksikromanolün Nanopartikül Aracılı Makrofaja İletiminin *In Vitro* Değerlendirilmesi

Öğrencinin Adı Soyadı : Eda İlayda Talaz

Danışmanın Adı Soyadı : Doç. Dr. Ahmet Erdi Sözen

Programın Adı : Biyokimya (Tıp) Yüksek Lisans Programı

Amaç : Bu çalışma, uzun zincirli Vitamin E metaboliti alfa-13-Karboksikromanolün (α -13'COOH) inflamasyon süreçlerindeki etkilerini, makrofajlara spesifik hedeflenmiş nanopartikül (NP) sistemleri aracılığıyla incelemeyi amaçladı. Çalışmada, α -13'COOH'ün makrofaj hücreleri ile etkileşiminin artırılması, metabolitin biyolojik aktivitesinin daha iyi anlaşılması ve inflamasyona modülatör etkilerinin değerlendirilmesi hedeflendi. Geliştirilen NP tabanlı taşıma sistemleri, α -13'COOH'ün düşük stabilite ve hızlı metabolize olma gibi sınırlamalarını aşarak, metabolitin makrofajlar üzerindeki potansiyel terapötik faydalarını analiz etmek ve inflamasyonun düzenlenmesinde yeni stratejiler sunmak amacıyla tasarlandı.

Gereç ve Yöntem : Makrofaj hedefli S2P kaplı α -13'COOH metaboliti yüklü ve yüksüz NP'ler önceden temin edildi. Ardından, primer hücre kültürü çalışmalarıyla makrofaj hücreleri farklılaştırıldı ve makrofaj-NP etkileşimi floresan mikroskopisi yöntemi ile incelendi. Hücre canlılığı MTT testi ve α -13'COOH seviyeleri LC-MS/MS yöntemi ile ölçüldü ayrıca TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-6 ve IL-1 β mRNA düzeyleri qRT-PCR yöntemiyle analiz edildi.

Bulgular : Makrofajlarla etkileşim sonrası NP birikimi incelendi ve MTT testi sonuçlarında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. LC-MS/MS analizinde, hedeflendirilmiş, NP'lerin hedeflendirilmemiş NP'lere kıyasla α -13'COOH düzeylerini anlamlı derecede artırdığı ve konsantrasyon artışıyla bu etkinin güçlendiği tespit edildi. qRT-PCR sonuçlarına göre, TNF- α ekspresyonunda hedeflendirilmiş 0,5 μ M NP grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlendi.

Sonuç : Hedeflendirilmiş NP'lerin α -13'COOH düzeylerini artırdığı belirlendi ayrıca TNF- α ekspresyonunun baskılandığı saptandı. Bu bulgular, α -13'COOH'ün inflamasyonun düzenlenmesindeki iyileştirici potansiyelini ve NP sistemlerinin biyoteknolojik tedavi yaklaşımlarında kullanımını desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler : Vitamin E, α -tokoferol, α -13'karboksikromanol, nanopartikül, makrofaj

2. SUMMARY

Title of Thesis : Assessing The *In Vitro* Potential Of Nanoparticle-Mediated Delivery Of Alpha-13'carboxychromanol To Macrophages

Student Name, Surname : Eda İlayda Talaz

Supervisor Name : Assoc. Prof. Ahmet Erdi Sözen

Program Name : Biochemistry Master of Science Program (Med)

Objective : This study aims to investigate the effects of the long-chain Vitamin E metabolite alpha-13'carboxychromanol (α -13'COOH) on inflammation processes through macrophage-specific targeted nanoparticle (NP) systems. The study focuses on enhancing the interaction between α -13'COOH and macrophage cells, gaining a deeper understanding of the metabolite's biological activity, and evaluating its modulatory effects on inflammation. The developed NP-based delivery systems are designed to overcome the limitations of α -13'COOH, such as low stability and rapid metabolism, to analyze its potential therapeutic benefits on macrophages and propose novel strategies for regulating inflammation.

Materials and Methods : Macrophage-targeted S2P-coated α -13'COOH-loaded and unloaded NPs were pre-prepared, followed by the differentiation of macrophage cells through primary cell culture studies. The interaction between macrophages and NPs was examined using fluorescence microscopy. Cell viability was assessed via the MTT assay, and α -13'COOH levels were measured using LC-MS/MS. Additionally, mRNA levels of TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-6, and IL-1 β were analyzed using the qRT-PCR method.

Results : Following interaction with macrophages, NP accumulation was examined, and MTT assay results showed no significant differences between the groups. LC-MS/MS analysis revealed that targeted NPs significantly increased α -13'COOH levels compared to non-targeted NPs, with this effect becoming more pronounced as the concentration increased. According to qRT-PCR results, a statistically significant decrease in TNF- α expression was observed in the targeted 0.5 μ M NP group.

Conclusion : Targeted NPs were found to enhance α -13'COOH levels and suppress TNF- α expression. These findings support the therapeutic potential of α -13'COOH in inflammation modulation and highlight the utility of NP systems in biotechnological therapeutic approaches.

Keywords : Vitamin E, α -tocopherol, α -13'carboxychromanol, nanoparticles, macrophages

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Vitamin E'nin en aktif formu olan α -tokoferol ve onun karaciğerde oluşan uzun zincirli metaboliti α -13'-karboksikromanol (α -13'COOH), inflamasyon, kanser gelişimi, lipid dengesi ve ilaç metabolizması gibi birçok biyolojik süreçte kritik roller üstlenmektedir. Literatürde, α -13'COOH'ün güçlü anti-inflamatuar özellikler gösterdiği ve inflamatuvar sitokinlerin baskılanmasında etkin olduğu belirtilmiştir (Wallert ve ark., 2014). Bununla birlikte, α -13'COOH'ün kimyasal stabilitesinin düşük olması ve hızlı bir şekilde metabolize edilmesi, bu bileşiğin biyoyararlanımını sınırlamakta ve klinik uygulamalarda kullanımı önündeki temel zorluklar arasında yer almaktadır (Galli ve ark., 2017; Wallert ve ark., 2015).

Nanopartiküller (NP) küçük boyutları ve biyolojik bariyerleri aşabilmeleri gibi özellikleri sayesinde son yıllarda ilaç taşıma sistemleri olarak araştırmalarda aktif şekilde kullanılmaktadır. NP tabanlı taşıma sistemleri aracılığıyla, α -13'COOH'ün makrofajlara spesifik iletiminin sağlanması, bileşiğin hızlı metabolize olma ve düşük biyoyararlanım gibi sınırlamalarını aşarak etkinliğini artırabilecek bir strateji olarak değerlendirilmektedir. Bu sistemler, α -13'COOH'ün inflamatuvar süreçler üzerindeki etkilerinin optimize edilmesi ve inflamasyonla ilişkili hastalıkların tedavisinde yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi için önemli bir temel sunmaktadır (Wang ve ark., 2012).

Bu tez çalışması, α -13'COOH'ün kemik iliğinden türetilmiş makrofajlar üzerindeki etkilerini inceleyerek inflamasyon üzerindeki rolünü açıklamayı hedeflemektedir. Çalışmanın odak noktası, makrofaj hücrelerine spesifik olarak geliştirilen hedeflenmiş NP aracılığıyla α -13'COOH ve makrofajlar arasındaki etkileşimin artırılmasıdır. Bunun için öncelikle fare kemik iliğinden elde edilen hücrelerin makrofajlara farklılaştırılması gerçekleştirildi ve doğrulanmasını takiben α -13'COOH yüklü NP uygulamalarının inflamasyonla ilişkili parametreler üzerindeki etkisi saptandı.

Bu araştırma, α -13'COOH'ün inflamasyon sürecindeki rolünü aydınlatmayı ve bu bileşiğin tedaviye yönelik potansiyel etkilerini daha iyi anlamayı hedefledi. Nanopartikül tabanlı dağıtım sistemlerinin kullanımı, metabolitin hızlı metabolizmasını engelleyerek α -13'COOH'ün biyolojik etkilerini maksimum düzeye çıkarmayı sağlayabilir. Çalışmanın sonuçları, metabolik bozukluklar, inflamasyon ve kanser gelişimi gibi durumlar için yeni tedavi stratejilerinin

geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Bu araştırmanın α -13'COOH'ün NP aracılı makrofaja iletiminin *in vitro* değerlendirilmesi konu başlıklı benzer araştırmalara rehberlik etmesi beklenmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Vitamin E

4.1.1. Vitamin E ve taşınımı

William Fletcher, 1905 yılında, Beriberi hastalığının nedenlerini araştırırken gıdalardan özel faktörlerin çıkarılması halinde hastalıkların ortaya çıkabileceğini tespit etmiştir. Fletcher araştırması esnasında öğütülerek en dış katmanı çıkarılmamış (dövülmemiş) pirinç yemenin Beriberi hastalığını önlediğini, öğütülerek en dış katmanı çıkarılmış pirinç yani, beyaz pirinç yemenin ise bu sinir sistemi hastalığını önlemediğini keşfetmiştir. William Fletcher pirincin kabuğunda özel besinler bulunduğuna inanırken 1912 yılında Polonyalı bilim insanı Cashmir Funk, pirinç kabukları ile çalışması sırasında keşfettiği, gıdaların özel besleyici kısımlarına, yaşam anlamına gelen “vita” ve kimyasal yapılarında azot içeren bileşikler ifade eden “amine” kelimelerinden yola çıkarak “vitamine” adını vermiştir. “Vitamine” daha sonra bu bileşiklerin hepsinin nitrojen içermediği ve dolayısıyla hepsinde *amin* olmadığı keşfedilince “vitamin” olarak kısaltılmıştır (Sen ve ark., 2006). 1922 yılında Herbert Evans ve Katherine Bishop tarafından beslenme ve doğurganlık arasındaki ilişkiyi araştırırken vitamin E keşfedilmiştir (Bell, 1987). Doğurganlığı desteklediği için, 1924 yılında, Yunanca doğum anlamına gelen *tokos* ve doğurmak anlamına gelen *phero* kelimelerinden yola çıkılmış ve molekülün alkol özelliği için de *ol* eki eklenerek Sure tarafından vitamin E, tokoferol olarak adlandırılmıştır (Sen ve ark., 2006).

Vitamin E, yağda çözünen ve güçlü antioksidan özelliklere sahip bir grup bileşiği içermektedir. İnsan vücudu için esansiyel bir besin maddesi olan vitamin E, hücre zarlarını oksidatif hasara karşı koruyarak serbest radikal seviyelerini dengeler, bağışıklık sistemini destekler ve inflamasyonu modüle etmektedir. Vitamin E alımı için bitkisel yağlar, badem ve fındık gibi kuruyemişler, ıspanak ve brokoli gibi sebzeler ile avokado, kivi, papaya ve mango gibi meyveler zengin kaynaklar arasında yer almaktadır. Diyetle alınan vitamin E'nin emilimi, diğer yağda çözünen vitaminler ve kolesterol ile benzer bir süreç izlemektedir. Bu süreç, safra asitleriyle oluşan misellerin yardımıyla bağırsakta gerçekleşmekte ve pankreatik lipaz ve esterazlar, tokoferol esterlerini serbestleştirmektedir. Emilim sonrası tokoferoller, şilomikronlar aracılığıyla lenfatik sisteme geçmektedir. Karaciğerde ise vitamin E'nin metabolizması sitokrom P450 enzimleriyle başlamaktadır ve burada bulunan α -tokoferol

transfer proteini (α -TTP), α -tokoferolün diğer formlardan ayrımını yaparak plazmaya taşınmasını sağlamaktadır. Bu protein, α -TTP, α -tokoferole karşı yüksek afinitesiyle dikkat çeker ve plazmadaki tokoferol seviyesinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir (Torquato ve ark., 2020).

Vitamin E ailesi iki ana alt gruptan oluşur: tokoferoller ve tokotrienoller. Bu iki ana alt grup da kendi içerisinde α , β , γ , δ olmak üzere dört farklı gruba ayrılmaktadır (Sozen ve ark., 2019). Bunlar arasında α -tokoferolün, insan vücudunda en aktif form olduğu bilinmektedir. Karaciğerde metabolize olan α -tokoferol, uzun zincirli metabolit olarak bilinen α -13'-karboksikromanol (α -13'COOH) gibi bileşiklere dönüşür. Bu metabolitler, çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rol oynayarak, hücrelerin lipid dengesi, antioksidan savunma ve hücrel sinyalizasyon gibi fonksiyonlarını destekler (Azzi, 2021). Vitamin E'nin sağlığa olan faydaları birçok araştırma ile desteklenmektedir. Özellikle inflamasyon ve kanser gibi hastalıklarla ilişkisi üzerinde durulmaktadır.

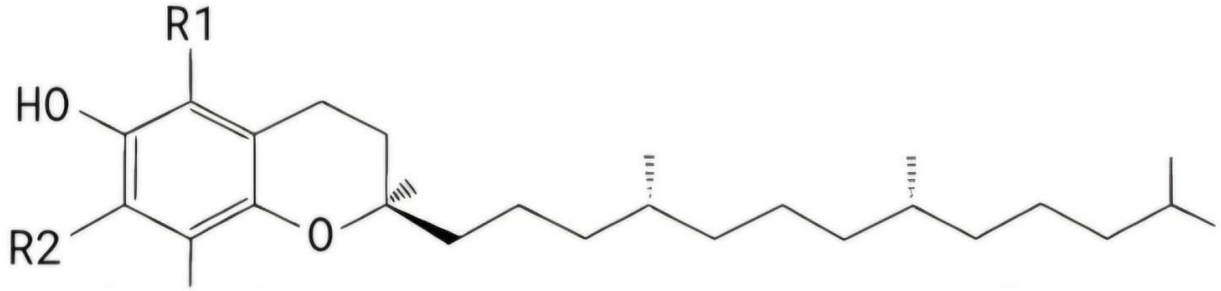
Vitamin E'nin anti-inflamatuar özellikleri, inflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltması ve hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasına yardımcı olmasıyla ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle, Vitamin E'nin yeterli alımının birçok hastalığın önlenmesinde kritik bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (Galli ve ark., 2017).

4.1.2. Vitamin E ve metabolizması

Tokoferoller, vitamin E ailesine ait bileşikler olup, temel yapılarında bir kromanol halkası ve fitil (phytyl) adı verilen uzun, doymuş bir yan zincir içermektedir (Şekil 1). Kromanol halkası, antioksidan özelliklerden sorumlu olan bir hidroksil (-OH) grubu taşımaktadır. Halkadaki metil gruplarının sayısı ve pozisyonu, α -, β -, γ -, ve δ -tokoferoller arasındaki farkları belirlemektedir (Xu ve ark., 2014).

Tokoferoller, vitamin E' nin en yaygın ve biyolojik olarak en aktif formudur. Özellikle α -tokoferol, plazmada diğer vitamin E formlarına kıyasla selektif olarak birikerek lipid peroksidasyonu önlemede önemli bir rol oynamaktadır. Bunun başlıca nedeni, karaciğerde yüksek düzeyde eksprese edilen α -TTP tarafından spesifik olarak tanınması ve seçilmesidir. α -TTP, α -tokoferolün plazma lipoproteinlerine sekrete edilmesini sağlamaktadır. Bu mekanizma, plazma α -tokoferol konsantrasyonlarının temel belirleyicisi olarak görev yapar ve bu nedenle α -TTP, vitamin E'nin biyoyararlanımında kritik öneme sahiptir (Aksoz ve ark., 2020). Dolayısı

ile de plazmada diğer formlardan daha çok bulunan α -tokoferol nispeten daha yavaş metabolize edilmektedir.



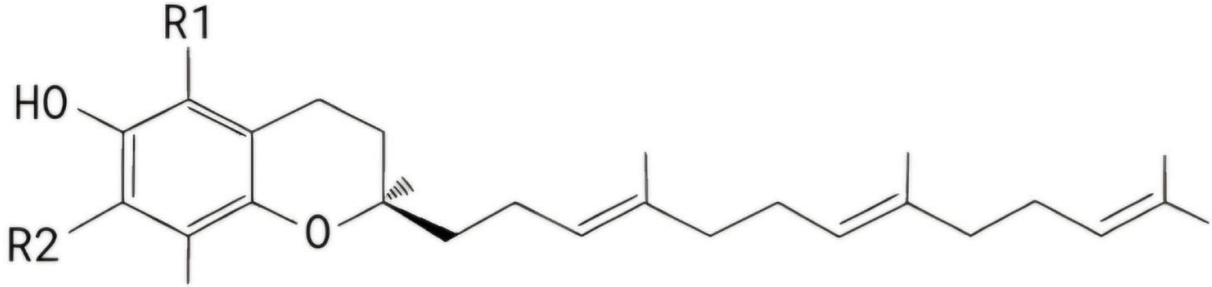
Şekil 1. Tokoferollerin kimyasal yapısı. (Xu ve ark., 2015’ den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

α -TTP'nin genetik mutasyonları, "Ataksi ile ilişkili vitamin E eksikliği" (AVED) adı verilen nadir bir hastalığa neden olmaktadır. AVED hastalarında, α -TTP geninde gözlenen mutasyonlar, α -tokoferolün hücresel taşıyım mekanizmalarını bozarak plazma seviyelerinin düşmesine yol açmaktadır. α -TTP'nin moleküler yapısına dair yapılan çalışmalar, bu proteinin α -tokoferolü endositozdan plazma membranına taşıdığını ve burada fosfatidilinositol-4,5-bifosfat (PI(4,5)P2) gibi fosfolipitlerle etkileşime girerek bağlı α -tokoferolü serbest bıraktığını göstermektedir. Bu süreç, α -tokoferolün vücuttaki etkin dolaşımını ve biyolojik rolünü sürdürmek için gereklidir (Arai & Kono, 2021).

Bu bilgiler ışığında, α -tokoferol, sadece güçlü antioksidan özellikleriyle değil, aynı zamanda hücresel seviyede spesifik taşıma ve seçici birikim mekanizmalarıyla da dikkat çekmektedir. Bu durum, α -tokoferolün diğer tokoferol izomerlerine ve tokotrienollere kıyasla biyolojik üstünlüğünü açıklamaktadır.

Tokotrienoller, yapı olarak tokoferollere benzese de isoprenoid bir yan zincir ile üç doymamış bağ içerirler ve bu özellikleri onları tokoferollerden ayırmaktadır (Şekil 2). Bu yapısal farklılık, tokotrienollerin beyin ve karaciğer gibi doymuş yağ tabakalarına sahip dokulara daha etkili bir şekilde nüfuz etmesini sağlar. Tokotrienoller, güçlü nöroprotektif, antioksidan, anti-kanser ve kolesterol düşürücü özellikler sergiler. Özellikle, mikromolar düzeylerde tokotrienollerin, kolesterol sentezinden sorumlu hepatik enzim olan HMG-CoA redüktazı baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca, antioksidan özellikleri tokoferollere kıyasla daha güçlüdür; çünkü hücre zarının yağlı katmanlarında daha iyi bir dağılım gösterirler ve serbest radikal temizleme etkinlikleri daha yüksektir. Bununla birlikte, tokotrienollerin biyoyararlanımı, α -tokoferole

kıyasla daha düşük olduğu için sıklıkla göz ardı edilmiştir (Sen ve ark., 2006). Daha önce bahsedilen α -TTP ve tokoferol ile ilişkili proteinlerin tokotrienollere afiniteleri tokoferollere göre daha düşük olduğu için tokotrienollerin plazmada daha az birikim göstermektedir (Arai & Kono, 2021).



Şekil 2. Tokotrienollerin kimyasal yapısı (Xu ve ark., 2015’ den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Vitamin E, toplamda sekiz farklı alt metabolit içeren ve biyolojik çeşitliliği ile dikkat çeken bir bileşiktir. Bu metabolitler, daha önce detaylıca bahsedilen iki ana grup olan tokoferoller ve tokotrienoller ile bu grupların halkasındaki metil gruplarının sayısı ve pozisyonlarına bağlı olarak α -, β -, γ -, ve δ - şeklinde alt gruplara ayrılmaktadır (Tablo 1). Tokoferol ve tokotrienollerin halkadaki metil gruplarının konumlarına göre sınıflandırılması, toplamda sekiz farklı metabolitin oluşmasını sağlamaktadır.

Tablo 1. Vitamin E’nin sınıflandırılması

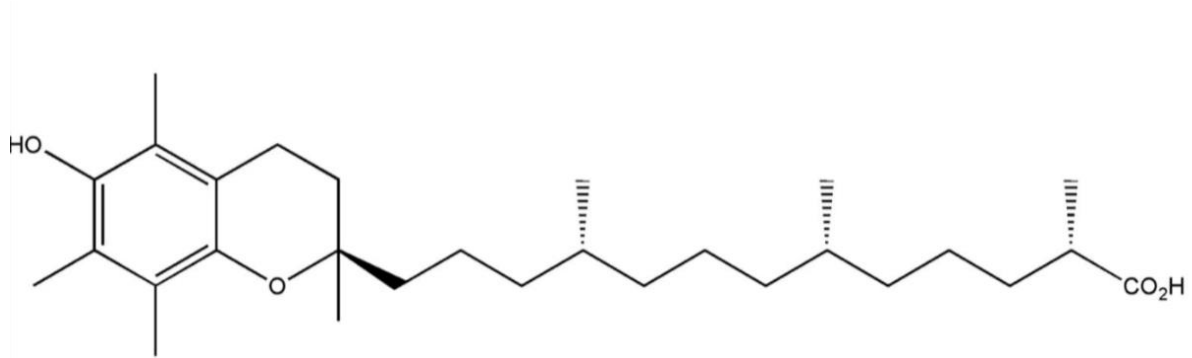
Sınıf	Tür	Kimyasal Yapı	R1	R2
Tokoferoller	α -Tokoferol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	CH ₃	CH ₃
	β -Tokoferol	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	CH ₃	H
	γ -Tokoferol	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	H	CH ₃
	δ -Tokoferol	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	H	H
Tokotrienoller	α -Tokotrienol	C ₂₉ H ₄₆ O ₂	CH ₃	CH ₃
	β -Tokotrienol	C ₂₈ H ₄₄ O ₂	CH ₃	H
	γ -Tokotrienol	C ₂₈ H ₄₄ O ₂	H	CH ₃
	δ -Tokotrienol	C ₂₇ H ₄₀ O ₂	H	H

Bunların yanı sıra kısa zincirli metabolitler (short chain metabolites, SCM), Vitamin E'nin karaciğerdeki metabolizmasının önemli bir sonucu olarak oluşmaktadır ve bu süreç, sitokrom P450 enzimleri tarafından katalize edilen ω -hidroksilasyon ile başlamaktadır. Bu süreç, vitamin E'nin yan zincirinin ω -hidroksilasyonu ile başlamakta ve ardından β -oksidasyon döngüleriyle devam etmektedir. İlk adımda, CYP4F2 enzimi tarafından 13'-hidroksikromanol (13'-OH) ve 13'-karboksikromanol (13'-COOH) gibi uzun zincirli metabolitler üretilmektedir. Bu metabolitler, karaciğer mitokondrilerinde β -oksidasyona uğrayarak, yan zincirlerinde karbon atomlarının iki veya üçerli gruplar halinde uzaklaştırılmasıyla kısa zincirli karboksikromanollere dönüşmektedir. Terminal metabolitlerden biri olan karboksietil-hidroksikroman (carboxyethyl hydroxymethoxy, CEHC), özellikle α - tokoferolden daha az biyolojik aktiviteye sahip diğer tokoferol ve tokotrienol izoformlarından daha fazla miktarda oluşmaktadır. Bu durum, α -tokoferolün CYP4F2 tarafından daha az katabolize edilmesi ve α -TTP'ine yüksek afinitesi ile açıklanmaktadır (Jiang, 2022; Torquato ve ark., 2020).

Kısa zincirli metabolitler, yalnızca eliminasyon ürünleri olarak değil, aynı zamanda biyoaktif moleküller olarak önemli roller üstlenmektedir. Örneğin, γ -CEHC'nin böbrekte natriüretik aktivite gösterdiği ve prostaglandin E2 (PGE2) üretimini inhibe ettiği bilinmektedir. Buna ek olarak, 13'-COOH metabolitleri, siklooksijenaz-1 ve -2 (COX-1/2) ile 5-lipoksijenaz (5-LOX) gibi enzimleri inhibe ederek güçlü anti-inflamatuar etkiler göstermektedir. Ayrıca, bu metabolitler hücrel lipid birikimini düzenlemekte, peroksizom proliferatör aktive edici reseptör-gamma (PPAR- γ) ve pregnan X reseptörü (PXR) gibi nükleer reseptörleri aktive etmektedir. Bu özellikler, kısa zincirli metabolitleri yalnızca vitamin E metabolizmasının bir yan ürünü değil, aynı zamanda terapötik hedefler olarak değerlendirilmesi gereken önemli moleküller haline getirmektedir (Jiang, 2022; Torquato ve ark., 2020).

α -13'-COOH kimyasal yapısı Şekil 3'te gösterilmektedir, α -tokoferolün karaciğerde metabolize edilmesiyle oluşmaktadır. Bu süreç, sitokrom P450 enzimleri (özellikle CYP4F2 ve CYP3A4) tarafından katalize edilen ω -hidroksilasyon ile başlamakta ve ardından peroksizomlarda gerçekleşen β -oksidasyon ile devam etmektedir. İlk olarak 13'-hidroksikromanol (13'-OH) ara metaboliti üretilmekte, bunu 13'-karboksikromanol (13'-COOH) izlemektedir (Schubert ve ark., 2022) α -13'-COOH, α -tokoferolden türetilen uzun zincirli metabolitler arasında en önemli moleküllerden biri olarak tanımlanmıştır ve insan plazmasında saptanabilir düzeyde

bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, α -13'-COOH'ün sadece metabolik bir son ürün değil, fizyolojik olarak aktif bir molekül olduğunu göstermektedir (Kluge ve ark., 2021).



Şekil 3. α -13'-COOH'ün kimyasal yapısı (Human Metabolome Database (HMDB0012555)'den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

4.2. İnflamasyon

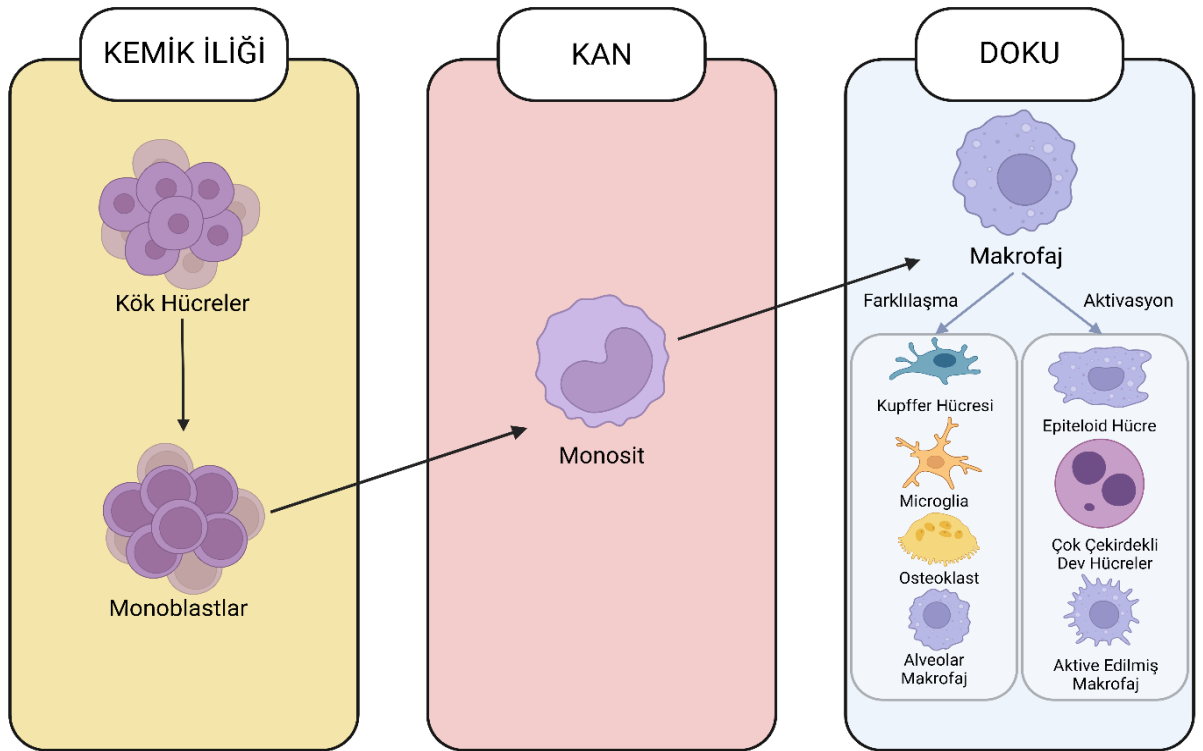
4.2.1. İnflamasyon ve makrofajlar

Koruyucu bir yanıt olan inflamasyon, toksinlerin veya patojenlerin organizmaya zarar vermesini önlemek ve hasar görmüş dokuların temizlenmesini sağlamak için gelişen dinamik ve karmaşık bir süreçtir. İnflamasyon, enfeksiyon ya da doku hasarının tanınmasıyla başlar ve bu süreç, bağışıklık hücrelerinin koordinasyonlu bir şekilde harekete geçmesini gerektirir. Dokuya sinyal veren proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler, lökositlerin hasarlı bölgeye göçünü ve burada patojenlerin etkisiz hale getirilmesini sağlar. Bu sürecin çözünme (resolution) aşaması, sadece pasif bir duraksama değil, anti-inflamatuar sinyal moleküllerinin (örneğin, resolvinler, lipoksinler) ve immün baskılayıcı sitokinlerin (interlökin (IL-10) ve transforming growth factor-beta (TGF- β)) aktif üretimiyle düzenlenen bir süreçtir. Enfeksiyonun başarılı bir şekilde çözünmesi ve hasarın onarılmasıyla inflamasyon sona ermektedir; ancak, inflamasyonu düzenleyen mekanizmalardaki bir dengesizlik, kronik inflamasyon ve doku hasarına yol açabilir (Serhan & Savill, 2005; Şentürk, 2013).

Makrofajlar, inflamasyonun çözünmesi ve dokunun yeniden yapılanmasında merkezi bir role sahiptir. İnflamasyonu başlatan pro-inflamatuar makrofajlar (M1), patojenlerin ortadan kaldırılması ve hasarlı dokuların savunulması sürecini yönetirken, anti-inflamatuar makrofajlar (M2), inflamasyonun çözülme aşamasında görev alır. M2 makrofajlar, IL-10 ve TGF- β gibi anti-inflamatuar sitokinleri salgılayarak inflamatuvar sinyalleri baskılar. Ayrıca, apoptotik hücrelerin fagositozu (efferositoz) yoluyla dokunun yeniden yapılandırılmasını destekler.

Efferositoz, yalnızca ölü hücrelerin temizlenmesiyle kalmaz, aynı zamanda anti-inflamatuar yanıtların tetiklenmesine katkıda bulunur. İnflamatuar yanıtın etkili bir şekilde çözülmesi hem dokunun fonksiyonel bütünlüğünü korumak hem de kronik inflamasyondan kaçınmak için kritik öneme sahiptir (Mantovani ve ark., 2004; Serhan & Savill, 2005).

Makrofajlar, mononükleer fagosit sisteminin temel bileşenleri olarak hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık yanıtlarında kilit bir rol oynamaktadır. Kemik iliğinden türeyen ve kan monositlerinden farklılaşarak dokulara göç eden makrofajlar, bulundukları mikro çevrenin sinyallerine bağlı olarak fonksiyonel özellikler kazanır (Şekil 4). İnflamasyon sırasında makrofajlar üç ana işlevi yerine getirmektedir: (1) Antijen sunumu; (2) Fagositoz; (3) Sitokin ve büyüme faktörlerinin sentezi. Bu fonksiyonel esneklik, makrofajların enfeksiyonun çözünmesinden yara iyileşmesine kadar geniş bir yelpazede görev almasını sağlar (Fujiwara ve Kobayashi, 2005).



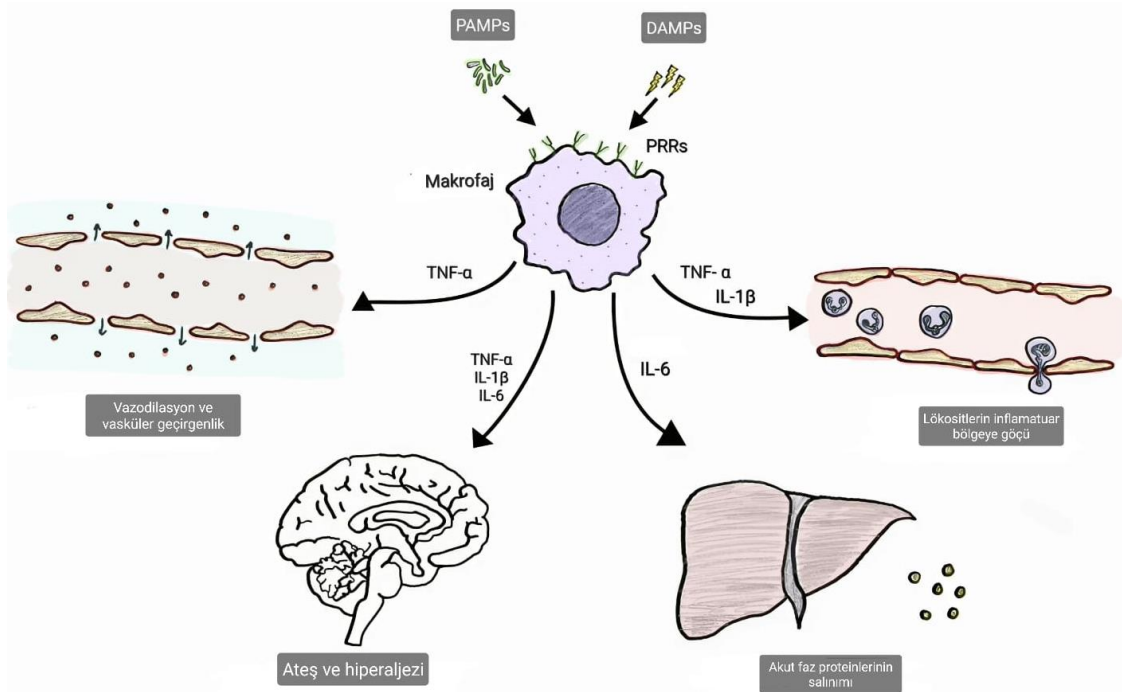
Şekil 4. Mononükleer fagositlerin olgunlaşması (Fujiwara ve Kobayashi, 2005'dan yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Makrofajların önemli işlevlerinden biri olan sitokin üretimi, inflamasyonun farklı evrelerinde farklı tip makrofajlar tarafından düzenlenir. Patojenler üzerindeki patojenle ilişkili moleküler desenler (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) veya hasarla ilişkili moleküler desenleri (damage-associated molecular patterns, DAMPs) tanıma reseptörleri (pattern recognition receptors, PRRs) aracılığıyla tanıyarak aktif hale gelen M1 makrofajlar, proinflamatuvar sitokinlerin salınımı yoluyla bağışıklık yanıtını hızla tetiklemektedir. Bu süreçte tümör nekroz faktörü α (TNF- α), IL-1 β , IL-6, IL-12 ve IL-23 gibi sitokinler M1 makrofajlardan salgılanmaktadır (Slaats ve ark., 2016).

TNF- α , inflamatuvar süreçlerin hızla başlamasını çeşitli mekanizmalar ve sinyal yolları üzerinden düzenlemektedir. Kan damarlarının iç yüzeyini kaplayan endotel hücrelerine bağlanarak bu hücrelerin aktivasyonunu tetiklemekte ve vasküler geçirgenliğin artmasına yol açmaktadır. Aktive olan endotel hücreleri, E-selektin, ICAM-1 ve VCAM-1 gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırarak lökositlerin damar duvarına yapışmasını ve inflamasyon bölgesine göçünü kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, TNF- α , endotel hücrelerinden CXCL8 (IL-8) gibi kemokinlerin salgılanmasını teşvik ederek nötrofillerin hasarlı dokulara yönlendirilmesine katkıda bulunmaktadır. Bu etkilerinin yanı sıra, TNF- α , bağlandığı TNF reseptörleri (TNFR1 ve TNFR2) aracılığıyla nükleer faktör κ B (NF- κ B) sinyal yolunu aktive etmekte ve proinflamatuvar genlerin transkripsiyonunu artırarak inflamatuvar yanıtın güçlenmesini sağlamaktadır (Horiuchi ve ark., 2010; Hayden & Gosh, 2014). IL-1 β , damar içi endotel hücrelerinde TNF- α ile benzer olarak almaktadır. IL-1 β , kan-beyin bariyerini aşarak hipotalamustaki prostaglandin E2 (PGE2) sentezini COX-2 enzimini aktive ederek ateş ve hiperaljeziyi tetiklemektedir (Şekil 5). Ekspresyonu artan PGE2, hipotalamusa etki ederek vücut sıcaklığının artmasına neden olmaktadır (Neeb ve ark, 2011). Ayrıca IL-1 β , IL-6 üretimini artırarak dolaylı bir yol üzerinden c-reaktif protein (CRP) sentezine katkıda bulunmaktadır (Slaats ve ark., 2016). IL-6 ise akut faz yanıtını tetikler ve hematopoetik süreçlerin düzenlenmesine katkıda bulunur. IL-6, hepatositlerde akut faz proteinlerinin üretimini JAK/STAT3 yolağının aktivasyonuna neden olarak artırmaktadır (Ngwa ve ark., 2022).

M2 makrofajlar ise M1 makrofajların aksine inflamasyonun çözülmesi aşamasında etkili olan hücrelerdir. M2 makrofajlardan salınan sitokinler IL-10 ve TGF- β olarak sıralanabilir. IL-10, özellikle proinflamatuvar bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu ve fonksiyonunu baskılayarak

anti-inflamatuar bir etki göstermektedir. IL-10'un temel sinyal iletim yolu JAK-STAT3 ve buna ek olarak da NF- κ B yolağıdır. STAT3 proteininin aktive olması ve dolayısı ile proinflamatuar genlerin ekspresyonunun baskılanmasında görev alan IL-10 ayrıca NF- κ B yolağını inhibe etmektedir. IL-10 I κ B α proteininin yıkımını engelleyerek NF- κ B'nin çekirdeğe taşınmasını önlemektedir ve dolayısı ile NF- κ B'nin hedef genleri olan TNF- α , IL-6 ve IL-1 β gibi sitokinlerin üretimini baskılamaktadır (Ouyang & O'Garra, 2019). IL-10, özellikle TGF- β aracılı fibrotik sinyalleri kontrol ederek aşırı ekstrasellüler matriks birikimini önlemekte ve fibrozisin ilerlemesini engellemektedir (Steen ve ark., 2019). TGF- β , Smad sinyal yolları üzerinden inflamasyonun çözülmesine yönelik genlerin ekspresyonunu artırarak anti-inflamatuar yanıtları desteklemektedir. Ayrıca, NF- κ B sinyal yolunun baskılanması yoluyla proinflamatuar sitokinlerin üretimini azaltmakta ve inflamatuvar yanıtın kontrol altına alınmasına katkıda bulunmaktadır. TGF- β , makrofajların M2 fenotipine farklılaşmasını teşvik ederek efferositoz sürecini destekler ve apoptotik hücrelerin etkin bir şekilde temizlenmesini sağlamaktadır. Regülatör T hücrelerinin (Treg) farklılaşmasını ve lipid türevli inflamatuvar düzenleyicilerin (örneğin, resolvinler ve lipoksinler) üretimini düzenleyerek inflamatuvar yanıtın sonlandırılmasına ve dokuların yeniden yapılandırılmasına katkıda bulunmaktadır (Sanjabi ve ark., 2017).



Şekil 5. Akut inflamatuvar yanıtın pro-inflamatuar sitokin salınımına aracılık etmesi. (Slaats ve ark., 2016' dan yararlanılarak hazırlanmıştır.)

4.2.2. İnflamasyon ve uzun zincirli vitamin E metabolitleri

Vitamin E'nin uzun zincirli metabolitleri, inflamasyonun düzenlenmesi ve çözünmesinde önemli biyolojik roller üstlenmektedir. Literatürde, bu metabolitlerin proinflamatuvar sinyal yollarını baskılaması, bağışıklık hücrelerini düzenlemesi ve inflamasyonun çözünmesine katkıda bulunması üzerine artan bir ilgi söz konusudur. Bu tez çalışmasının odak noktası olan α -13'-COOH, biyolojik olarak aktif bir moleküldür. α -13'-COOH'ün mikromolar düzeylerde birikmesi ile diğer metabolitlere oranla inflamasyon bölgelerinde daha etkin olduğu vurgulanmaktadır (Birringer & Lorkowski 2018).

Wallert ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, lipopolisakkarit (LPS) ile aktive edilmiş fare makrofaj hücrelerinde α -13'-COOH uygulamasının etkisi incelenmiştir. Çalışmada, α -13'-COOH'ün inflamasyon yanıtı üzerindeki etkileri araştırılmış ve bu metabolitin proinflamatuvar yolları inhibe ettiği bulunmuştur. α -13'-COOH'ün, LPS ile uyarılan makrofajlarda, α -tokoferolden daha etkili bir şekilde proinflamatuvar genlerin düzeyini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Özellikle IL-1 β düzeyi bu metabolit tarafından önemli ölçüde bloke edilmiştir. Bunun yanı sıra, α -13'-COOH'ün, LPS tarafından indüklenen IL-10, COX-2 ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) düzeyini azaltarak nitrik oksit ve prostaglandin üretimini önemli ölçüde düşürdüğü belirlenmiştir. α -13'-COOH'ün, NF κ B p65 alt biriminin translokasyonundan bağımsız olarak etki gösterdiği de dikkat çekici bir bulgudur. Sonuç olarak, bu çalışma α -tokoferolün inflamasyon yanıtı üzerindeki etkilerini yeni bir bakış açısıyla ele alarak, α -13'-COOH'ün potansiyel bir anti-inflamatuvar molekül olduğunu göstermektedir (Wallert ve ark., 2015)

α -13'-COOH'ün inflamasyon üzerindeki etkileri, α -tokoferolden farklı mekanizmalarla ortaya çıkmaktadır. Örneğin, α -13'-COOH, NF- κ B p65 alt biriminin nükleer translokasyonuna bağlı olmaksızın inflamatuvar gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Bu durum, α -13'-COOH yalnızca bir antioksidan molekül değil, aynı zamanda bağımsız bir sinyalizasyon molekülü olarak işlev gördüğünü göstermektedir. Ayrıca, bu metabolitin yağ dokusu makrofajlarında lipid metabolizmasıyla ilişkili gen ekspresyonunu modüle ederek hücrel lipid birikimini azalttığı ve aterosklerotik süreçleri inhibe ettiği rapor edilmiştir (Schmölz ve ark., 2016; Wallert ve ark., 2015).

α -13'-COOH, hücresel lipid metabolizmasını ve inflamasyon süreçlerini düzenlemede önemli bir biyomolekül olarak öne çıkmaktadır. Son araştırmalar, α -13'-COOH'ün sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1 (SREBP1) ve stearoil-CoA desatüraz 1 (SCD1) aktivitesini inhibe ederek lipid desatürasyonunda dengesizliklere yol açtığını ve böylece hücre döngüsü durdurma ve hücre ölümü indüksiyonu gibi etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, α -13'-COOH'ün kanser hücreleri üzerindeki potansiyel iyileştirici etkilerini ve lipid metabolizmasının düzenlenmesindeki rolünü vurgulamaktadır (Liao ve ark., 2023).

α -13'-COOH, insan plazmasında sistemik biyoyararlanıma sahip bir molekül olarak inflamasyonun düzenlenmesinde tedaviye yönelik bir ajan potansiyeli taşımaktadır. Bu molekülün biyolojik etkileri hem akut hem de kronik inflamatuvar süreçlerin kontrol altına alınmasında önemli bir rol oynamaktadır. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar, α -13'-COOH'ün proinflamatuvar mediatörlerin üretimini baskılama ve makrofajların fonksiyonel aktivitesini düzenleme kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Bu özellikler, α -13'-COOH'ü yalnızca akut inflamasyonun çözülmesinde değil, aynı zamanda ateroskleroz ve otoimmün hastalıklar gibi kronik inflamasyona bağlı patolojilerin tedavisinde de değerli bir hedef haline getirmektedir. Ancak, klinik uygulamalarda karşılaşılan en önemli sınırlayıcı faktörlerden biri, α -13'-COOH'ün metabolik ve kimyasal stabilitesinin düşük olmasıdır (Riedl ve ark., 2023; Wallert ve ark., 2015).

α -13'-COOH'ün kimyasal stabilitesi, çevresel koşullara karşı hassasiyeti ile doğrudan ilişkilidir. pH, sıcaklık ve ışık gibi dış faktörler, molekülün yapısal bütünlüğünü ve dolayısıyla biyolojik işlevselliğini önemli ölçüde etkileyebilir. Asidik ve alkalik ortamlar, α -13'-COOH'ün kimyasal bağlarının bozulmasına neden olarak, molekülün biyolojik etkilerinin kaybına yol açabilir. Sıcaklık artışı ise metabolitin hızla dekompoze olmasına sebep olarak stabilitesini daha da azaltabilir. Bu nedenle, α -13'-COOH'ün terapötik etkilerinin sürdürülebilmesi için stabilitesini artırmaya yönelik stratejiler geliştirilmesi gereklidir.

Metabolitin biyolojik stabilitesi ise enzimatik aktiviteler ve diğer metabolitlerle olan etkileşimlerine bağlıdır. Özellikle makrofajlar gibi hedef hücrelerin ürettiği enzimler, α -13'-COOH'ün biyoyararlanımını ve terapötik etkinliğini doğrudan etkileyebilir. Bu bağlamda, α -13'-COOH'ün makrofaj mikrosistemindeki metabolik davranışının incelenmesi, molekülün

terapötik potansiyelini daha iyi anlamak açısından kritik öneme sahiptir (Bartolini ve ark., 2021; Riedl ve ark., 2023).

α -13'-COOH'ün kimyasal ve biyolojik stabilitesinin değerlendirilmesinde ileri analitik yöntemler önemli bir yer tutmaktadır. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (high performance liquid chromatography, HPLC), metabolitin saflaştırılması ve kantitatif analizi için tercih edilirken; Nükleer Manyetik Rezonans (NMR), molekülün yapısal özelliklerinin detaylı incelenmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca, Kütle Spektrometrisi (mass spectrometry, MS), α -13'-COOH'ün metabolik ürünlerinin izlenmesi ve kimyasal modifikasyonlarının değerlendirilmesinde kritik bir rol oynar. Bu yöntemlerin kombinasyonu, metabolitin çevresel ve biyolojik koşullara karşı duyarlılığını anlamak ve bu doğrultuda stabilizeyi artırıcı yaklaşımlar geliştirmek için gereklidir (Lienau ve ark., 2002).

4.3. İlaç Taşıma Sistemleri

Küçük boyutları ve biyolojik bariyerleri aşma yetenekleri sayesinde modern ilaç taşıma sistemleri önemli bir yere sahiptir. 10-1000 nm çapında kolloidal yapılar olarak tanımlanan NP'ler, hem teşhis hem de tedavi amaçlı kullanılabilir. Özellikle biyoyumlu ve biyobozunur polimerlerden üretilen polimerik NP'ler, toksisiteyi en aza indirirken ilaç moleküllerinin hedef bölgelere güvenli ve kontrollü bir şekilde iletilmesini sağlar. PLGA (poli(laktik-ko-glikolik asit)) gibi FDA onaylı polimerler, NP'lerin üretiminde yaygın olarak kullanılmakta ve üstün biyolojik uyumluluk ile düşük sistemik toksisite sunmaktadır. PLGA NP'ler, ilaçların stabilitesini artırırken kontrollü ve sürdürülebilir bir salınım sağlamaktadır. PLGA'nın laktik asit ve glikolik asit oranı, molekül ağırlığı ve yüzey modifikasyonları, NP'lerin bozunma hızını ve ilaç salınım profilini etkilemektedir (Singh & Lillard, 2009; Yih & Al-Fandi, 2006).

4.3.1. Makrofaj hedefli nanopartiküller

Nanopartiküllerin hedeflendirilmiş ilaç taşıma sistemlerinde kullanımı, iyileştirici etkisini artırmak ve yan etkileri en aza indirmek için önemlidir. Pasif hedefleme mekanizmalarının yanı sıra, yüzey modifikasyonları ile aktif hedefleme yapılabilir. Stabilin-2 reseptörlerine spesifik olarak bağlanan S2P peptidi, makrofaj hedefli NP'lerde yaygın olarak kullanılan bir biyomolekül örneğidir. Makrofajlar, inflamasyon süreçlerinde kritik bir rol oynadığı için, α -

13'COOH gibi anti-inflamatuvar ilaçların bu hücrelere spesifik olarak iletilmesi, kronik inflamasyon tedavisi açısından büyük önem taşımaktadır (Tao ve ark., 2020).

Nanopartiküllerin yüzey özellikleri, biyolojik sistemlerle etkileşimlerini ve iyileştirici etkinliklerini belirlemektedir. Örneğin, DSPE-PEG gibi polimerler ile kaplanan NP'ler, kan dolaşımında daha uzun süre stabil kalabilmekte ve immün yanıt riskini azaltmaktadır. Ayrıca, DSPE-PEG-Mal gibi fonksiyonelleştirilmiş yüzey kaplamaları, peptid gibi hedefleyici ajanların bağlanmasına olanak tanıyarak NP'lerin hedef spesifikliğini artırmaktadır. Bu yaklaşımlar, özellikle inflamasyonun tedavisinde NP'lerin etkinliğini artıran stratejilerdir (Wang ve ark., 2012).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmaya ait deneyler Marmara Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlar'ında ve bazı ekipmanlar gereği Genetik ve Metabolik Hastalıklar Araştırma ve Araştırma Merkezi'nde ve Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde gerçekleştirildi.

5.1. Gereçler

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar uygun kalite ve saflıktaydı.

5.1.1. Kimyasallar

Anti-F4/80	eBioscience, 11-4801-81
BHT	Sigma-Aldrich, W218405
Cell Stripper	Corning, 25-056-CI
DAPI	Invitrogen, 62247
DMEM	Gibco, 41966029
EtOH	Merck, 100983
FBS	Gibco, 10500064
Hekzan	Merck, 104367
Kloroform	Merck, 1776045
L-Glutamin	Gibco, 25030024
MTBE	Merck, 101843
MTT	Glentham, GC4568
PBS	Gibco, 14190144
Penicillin-Streptomycin	Gibco, 15140122
Trypsin 0.25% EDTA	Gibco, 25200056
Trizol	Invitrogen, 15596026

5.1.2. Kitler

PureLink RNA Mini Kit	Thermo Scientific, 12183018A
High Capacity cDNA Reverse Transcription kit	Thermo Scientific, 4368814
Power UP SYBR Green Master Mix	Thermo Scientific, A25741S

5.1.3. Sarf malzemeleri

Tissue Culture Flask, 75 cm ²	Sarstedt, 833.911.002
Tissue Culture Petri, 100mm	Sarstedt, 821.472
Petri Kabı, 100 mm	Nest, 752401
96 Kuyulu Plaka	Sarstedt, 83.3924
5 mL Serolojik Pipet	Costar, CLS4487
10 mL Serolojik Pipet	Costar, CLS4488
25 mL Serolojik Pipet	Costar, CLS4489
1.5 mL Mikrosantrifüj Tüp	Isolab, 078.03.022
2 mL Mikrosantrifüj Tüp	Isolab, 078.03.023
15 mL Santrifüj Tüpü	Sarstedt, 62.554.502
50 mL Santrifüj Tüpü	Sarstedt, 62.547.274
Filtre (40 µm)	Sorfa Life, SCS401

5.1.4. Ekipmanlar

-20 °C Dondurucu	Haier
-80 °C Dondurucu	Sanyo
-150°C Dondurucu	Sanyo
Buzdolabı	Bosch
CO ₂ 'li İnkübatör	Nuarie
Floresan mikroskopu	Leica, DFC310 FX
Flow sitometri	Becton-Dickinson
Hassas terazi	Shimadzu
Hava Akım Kabini	Labgard
LC/MS-MS	Agilent Technologies
Mikropipet Seti	Gilson
Nanodrop cihazı	Agilent
Otoklav	Zealway
Soğutmalı mikrosantrifüj	Beckman Coulter
Soğutmalı santrifüj	Sigma Aldrich

Spektrofotometre

Perkin Elmer - EnSpire

Spin santrifüj

Bio-Rad

Vortex

Bio-Rad

5.2. Yöntemler

5.2.1. Nanopartiküllerin hazırlanması

Bu tez çalışmasından kullanılan NP'lerin hazırlanması, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen "Anti-İnflamatuvar İlaç İçeren ve Hedefli PLGA Nanoparçacıkların Hazırlanması ve *In Vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı tez çalışmasında tanımlanan yöntemlere dayanmaktadır.

5.2.2. Fare kemik iliğinden türetilmiş makrofaj hücreleri eldesi

Kemik iliği hücrelerinin makrofajlara farklılaştırılması için literatürdeki çalışmalar kullanıldı (Proto ve ark., 2018). Bu doğrultuda, farelere ksilazin hidroklorür ile derin anestezi yapılmasını takiben servikal dislokasyon ile ötanazi gerçekleştirildi ve uyluk kemikleri serbestleştirildi. Serbestleştirilen uyluk kemikleri şırınga kullanılarak ilik içeriği 1-2 mL DMEM ile yıkandı ve ilik dokusu elde edildi. Pipetleme ve vorteks ile homojen hale getirildi. Ardından 500 g, +4°C'de 10 dakika santrifüjün ardından elde edilen pellet makrofaj farklılaştırma besiyerinde (%20 L-929 besiyeri, %10 FBS, 10 U/mL Penicillin ve 100 µg/mL Streptomycin içeren DMEM) süspanse edilerek, flasklara ekim gerçekleştirildi. Bu flasklar 37°C, %5 CO₂ ortamı sağlanan inkübatöre yerleştirildi, üç günde bir besiyerleri değiştirilen makrofaj hücreleri için farklılaştırma protokolü devam ettirildi. İzole edilen hücreler 14-21 gün içerisinde belirtilen deneyler için kullanıldı.

Bu çalışma, Doç. Dr. Ahmet Erdi Sözen'in yürütücülüğünde gerçekleştirilen 121S687 no'lu ve "Makrofaj Hedefli Uzun Zincirli Vitamin E Metaboliti α -13'-COOH Yüklenmiş Nanopartiküllerin Hazırlanması ve *In Vitro* ve *In Vivo* Deney Modellerinde İncelenmesi" başlıklı TÜBİTAK 1001 projesi ile ilişkilidir. İlgili etik kurul onayı 121S687 no'lu proje kapsamında 05.08.2021 tarihinde Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Karar no: 2021/53) alınmıştır.

5.2.3. Nanopartikül maruziyeti ve deney gruplarının oluşturulması

NP uygulanmayan kontrol grubu makrofajlarına yalnızca makrofaj farklılaştırma besiyeri eklendi. Optimum etkinin belirlenmesi amacıyla NP uygulanan gruplara 0,25; 0,5 ve 1 μM konsantrasyonda α -13'-COOH içerecek şekilde NP maruziyeti gerçekleştirildi ve hücreler Tablo 2 ve Tablo 3'te belirtilen deney gruplarına ayrıldı. Belirlenen konsantrasyonda hazırlanan α -13'-COOH yüklü NP'lerin 37°C, %5 CO₂ inkübasyon süresi 24 saat olarak uygulandı.

Tablo 2. MTT ve LC-MS/MS deney grupları

Grup	NP Tipi	α -13'-COOH Konsantrasyonu
1	-	-
2	S2P içermeyen (Hedeflendirilmemiş)	α -13'-COOH yüklenmemiş (Boş NP)
3		0,25 μM
4		0,5 μM
5		1,0 μM
6	S2P içeren (Hedeflendirilmiş)	α -13'-COOH yüklenmemiş (Boş NP)
7		0,25 μM
8		0,5 μM
9		1,0 μM

Uygulanan farklı α -13'-COOH konsantrasyonları arasından hücre canlılığı, α -13'-COOH düzeyi değerlendirilerek etkin konsantrasyonlar 0,5 μM olarak belirlendi. Tablo 3'te gösterilen deney grupları qRT-PCR deneylerinde kullanıldı.

Tablo 3. qRT-PCR deney grupları

Grup	NP Tipi	α -13'-COOH Konsantrasyonu
1	-	-
2	S2P içermeyen (Hedeflendirilmemiş)	α -13'-COOH yüklenmemiş (Boş NP)
3		0,5 μ M
4	S2P içeren (Hedeflendirilmiş)	α -13'-COOH yüklenmemiş (Boş NP)
5		0,5 μ M

Belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanan NP'lerin maruziyeti bir gün önceden gerçekleştirildi ve makrofaj hücreleri NP içeren bu besiyeri ile gece boyu 37°C, %5 CO₂ inkübe edildi. Gece boyu inkübasyon sonrasında makrofaj hücrelerindeki NP birikimi floresans mikroskopu ile belirlenebilmesi için öncelikle NP içeren besiyeri uzaklaştırıldı, hücreler PBS ile yıkandı ve çekirdekleri DAPI ile işaretlendi. Sentez aşamasında NP'ler FITC (fluorescein isothiocyanate) floresan probu ile etiketlendikleri için NP düzeyini belirlenmesi adına yapılan görüntüleme öncesi herhangi bir işaretleme yapılmadı. Floresans mikroskop altında fotoğraflar çekildi ve makrofaj hücrelerindeki NP miktarı belirlendi.

5.2.4. MTT testi ile hücre canlılığının belirlenmesi

96-kuyulu plakalara hücre ekimi için öncelikle 1X PBS ile yıkanan hücreler 8 mL 10 dakika Cell Stripper uygulamasını takiben 2 mL Tripsin uygulaması ile kaldırıldı ve hemositometrenin 16 karelik alanda sayımları sonrası belirtilen denklem kullanılarak hesaplamalar yapılmış 96 kuyulu plakaya 10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde ekim gerçekleştirildi.

$$\text{Toplam hücre} = \frac{\text{hücre sayısı} * \text{dilüsyon faktörü} * 10^4}{\text{hemisitometrede sayılan kare sayısı}} \text{ hücre/ml}$$

37°C, %5 CO₂ inkübatörde bir gece inkübasyonları sonrasında Tablo 2'de ifade edilen deney grupları oluşturuldu ve belirtilen konsantrasyonlarda 24 saat boyunca NP uygulandı. MTT testinin başlangıcı öncesi PBS ile yıkanan hücreler, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (5 mg/ml) ile inkübe edilerek 30'ar dakika arayla kontrol edildi

ve formazan kristallerinin oluşumu takip edildi. Formazan kristallerinin gözlenmesinin ardından MTT ayırıcı eklenmiş besiyeri hücrelerden çekildi, 100 µl DMSO (Dimetil Sülfoksit) eklendi ve ışısız ortamda 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde 570 nm de absorpsiyon ölçümü alınıp analizi takiben hücre canlılığı belirlendi.

5.2.5. LC-MS/MS ile α -13'-COOH düzeyinin belirlenmesi

Tablo 2'ye göre ayrılan gruplarda gerçekleştirilen uygulamaların ardından hücreler gece boyu inkübasyona bırakıldı. 1X PBS ile yıkandıktan sonra hücreleri flasklardan toplayabilmek için Cell Stripper 10 dakika boyunca uygulandı ve toplanan hücreler 5 dakika 500 g 24°C'de santrifüj edildi. Santrifüj ile çöktürülen pellet halindeki hücrelere 0,25 M sodium asetat solusyonunda hazırlanmış askorbik asit, beta glukorinidaz ve sülfataz eklenerek 34°C,'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, konsantre asetik asit ve etanol eklenen örnekler, 2:1 (v/v) oranında hazırlanmış hekzan: MTBE (Metil tert bütıl eter) içerisinde %0,1'lik BHT (Bütillenmiş hidroksi toluene) olan ekstraksiyon solusyonu eklendi. Örnekler bir dakika vorteks edilip 3200 g'de 10 °C'de 5 dakika santrifüj sonrası elde edilen organik faz toplandı. Toplanan organik faz azot gazı altında uçurularak elde edilen kuru ekstrakt 3:1 (v/v) oranında hazırlandı ve 1 mg/L BHT (marka) içeren, MetOH: dH₂O solusyonunda çözülerek LC-MS/MS'e enjekte edildi. MRM (Multiple Reaction Monitoring) analiz metodu kullanıldı. Asetonitril ve deiyonize saf suyun 1:1 (v/v) oranındaki karışımı, analizlerde mobil faz olarak ve 0.5 mL/dk akış hızında kullanıldı. Saf ilaç solusyonundan 5 µL örnek çekilerek MS2Scan modunda 50-1500 Da aralığında bir iyonlaşmaya bağlı tarama yapıldı. Teorik moleküler ağırlığı 460.69 g/mol-1 olan α -13'-COOH molekölü için, tarama metodunda +1 yüklü hali olarak 459,2 m/z değeri görüldü. Daha sonra MS2SIM (Single Ion Monitoring) metodunda bu pik değeri üzerine farklı parçalanma enerjileri ile pik yoğunlukları üzerine analizler yapıldı, total moleküler iyonu olan bu iyonla yola devam edilmesine karar verildi. Dolayısıyla, α -13'-COOH molekölüne özgü, MRM (Multiple Reaction Monitoring) metodu oluşturuldu, C18 kolonu (Gemini C18 analytical column- 100 mm×2.0 mm, 3.0 µm, 100 Å) ile ayırım sağlandı. Örneklerdeki α -13'-COOH düzeyinin belirlenmesinde "Area Under Curve" olarak isimlendirilen pik altı alan baz alındı.

5.2.6. İnflamasyonla ilişkili sitokinlerin mRNA ekspresyonlarının belirlenmesi

5.2.6.1. RNA izolasyonu

Tablo 3'te belirtilen gruplarda uygulamaların ve gece boyu inkübasyonun ardından 1X PBS ile yıkandıktan sonra hücreleri flasklardan toplayabilmek için Cell Stripper 10 dakika boyunca uygulandı ve toplanan hücreler 5 dakika 500 g 24°C'de santrifüj edildi. Santrifüj ile çöktürülen pellet halindeki hücrelere 500 µl TRIzol üzerine 100 µl klorom uygulandı. Örnekler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve takiben 4°C 20 dakika 10.000 g'de santrifüj edildi. Süpernatant yeni temiz mikrosantrifüj tüplerine aktararak alınan süspansiyon miktarı kadar saf EtOH eklendi ve pipetajlama ile iyice karıştırıldı. Süspansiyonlara 2 ml'lik tüpte bulunan spin kolonlara aktarıldı ve 12.000 g'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj edildi. Süpernatant atılarak 700 µL yıkama tamponu I spin kolonlar üzerine aktararak oda sıcaklığında 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kolonlara 500 µL yıkama tamponu II eklenerek oda sıcaklığında 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edilip bu işlem tekrarlandı. Kolonlar temiz bir tüpe alındı ve 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolonlar temiz 1,5 ml'lik eppendorf tüpe alınıp üzerine 20 µL RNaz içermeyen elüsyon tamponu eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu takiben 12.000 g'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Örneklerle ait RNA konsantrasyonu "Take3 Multi-Volume Plate" kullanılarak mikroparka okuyucusunda ölçüldü. Ölçüm sonrası örnekler cDNA sentezinde kullanıldı.

5.2.6.2. Total RNA'dan cDNA sentezi

cDNA sentezi High Capacity cDNA Reverse Transcription kit kullanılarak yapıldı. Her bir örnekten 1500 ng RNA içerecek hacimlerde alındı ve önerilen protokole uygun şekilde 10 µL 2X Master Mix karışımı her tüpün içerisine eklendi. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde RNase içermeyen su ile tamamlandı. 10 µL 2X Master Mix solüsyonu ise 2 µL 10X Reverse Transkripsiyon (RT) Tamponu, 0.8 µL 25X dNTP Mix, 2 µL 10X RT Random Primer, 1 µL Multicribe RT ve RNase içermeyen sudan oluşturuldu. Örnekler; 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 2 saat, 85°C'de 5 dakika, olacak şekilde "Thermal Cycler" cihazına konuldu. Program bitiminin ardından cDNA' lar 10 ng/µL olacak şekilde RNase içermeyen su ile sulandırılarak -20°C'de saklandı.

5.2.6.3. qRT-PCR deneyleri

Tayin edilecek genler için, Mus Musculus TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-6 ve IL-1 β Entrez Pubmed Nucleotid programında Fatsa formatları (mRNA tüm dizisi) saptandı. FATSa formatı primer tasarımı için Primer 3 Output programında yerleştirilerek Tablo 4'te gösterilen primer dizileri elde edildi. Sentezlenen cDNA örneklerinin çoğaltılması kit kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir örnek için 5 μ l Sybr Green, 0,5 μ l forward primer, 0,5 μ l reverse primer, 2 μ l cDNA ve 2 μ l RNAaz elimine su eklenerek total hacmi 10 μ l olan karışım hazırlandı. Örnekler, üç kez tekrar edildikten sonra Ct değerleri GAPDH Ct değerlerine göre normalize edildi, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ hesaplandı. Kontrol grubu %100 kabul edilerek diğer gruplar değerlendirildi.

Tablo 4. Ekspresyonu saptanacak genlere ait primer dizileri

Gen	5' Primer	3' Primer
GAPDH	ATGGTGAAGGTCGGTGTGAA	TGGAAGATGGTGATGGGCTT
TGF- β	AGAGCCCTGGATACCAACTAT	AGGACCTTGCTGTACTGTGT
IL-10	AGTACAGCCGGAAGACAAT	AGCTTCTCACCCAGGGAATTA
IL-6	TTCTTGGGACTGATGCTGGT	CATTTCACGATTTCCCAGAGA
IL-1 β	ACTCATTGTGGCTGTGGAGA	TTGTTTCATCTCGGAGCCTGT
TNF- α	TCCTGAGTTCTGCAAAGGGA	CCCCGGCCTTCCAAATAAAT

5.2.7. Kullanılan istatistiksel yöntemler

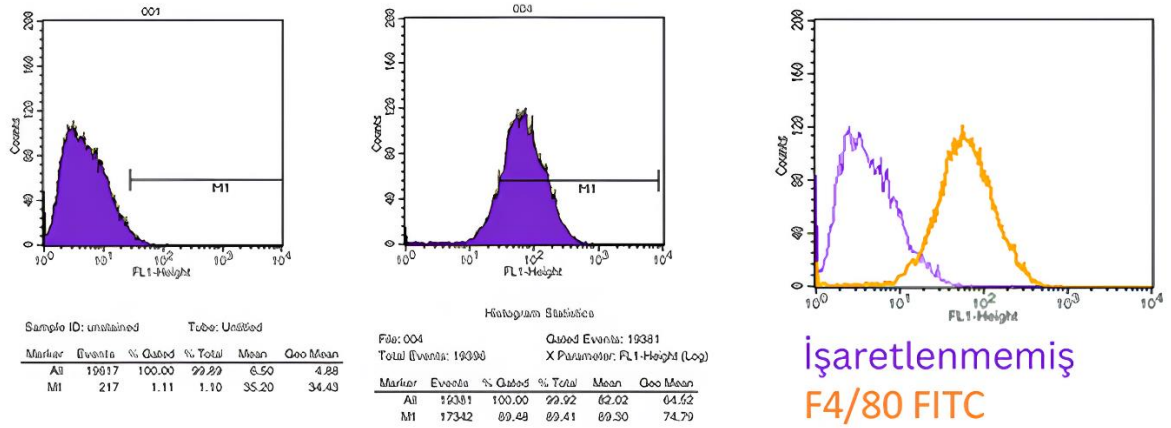
Bu tez çalışmasındaki hücre deneyleri üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Grup sayısı ikiden fazla olduğu için ANOVA testi uygulandı ve p değeri 0,05' den küçük sonuçlar anlamlı kabul edildi. Değerler ortalama standart sapma olarak gösterildi. İstatistiksel analizler GraphPad yardımı ile hesaplandı.

6. BULGULAR

Bu tez çalışması, α -13'COOH'un makrofajlara doğrudan iletilmesi amacıyla geliştirilen NP tabanlı bir taşıyıcı kullanılması ve bu metabolitlerin düşük stabilitesinin yarattığı engeli aşmayı hedefledi. Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesinde Doç. Dr. Özgül Gök danışmanlığında geliştirilen NP sistemi kullanılarak α -13'COOH'un hücrelere etkili bir şekilde taşınması ile metabolitin biyolojik etkilerini artırmak hedeflendi. Bu yaklaşımın, metabolitlerin hızlı degradasyonunu önleyerek, inflamasyon ve diğer hastalıklara yönelik tedaviye yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesinde etkili olacağı düşünüldü.

6.1. Farklılaşmış Makrofaj Hücrelerinin Akış Sitometrisi ile Doğrulanması

Makrofajlar fare kemik iliği hücrelerinden elde edildikten sonra makrofaj fenotipine ulaşım ulaşmadığını doğrulamak amacıyla analizler gerçekleştirildi. Makrofajlara özgü bir belirteç olan FITC işaretli F4/80 antikoru kullanılarak hücreler işaretlendi ve akış sitometri yöntemiyle analiz edildi. İşaretlenmemiş kontrol hücreleriyle yapılan kıyaslamalar sonucunda, hücrelerin %89,48 oranında F4/80 pozitif olduğu tespit edildi. Bu bulgular, kemik iliği kaynaklı hücrelerin büyük bir çoğunluğunun makrofaj fenotipine başarıyla farklılaştığını doğruladı (Şekil 6).

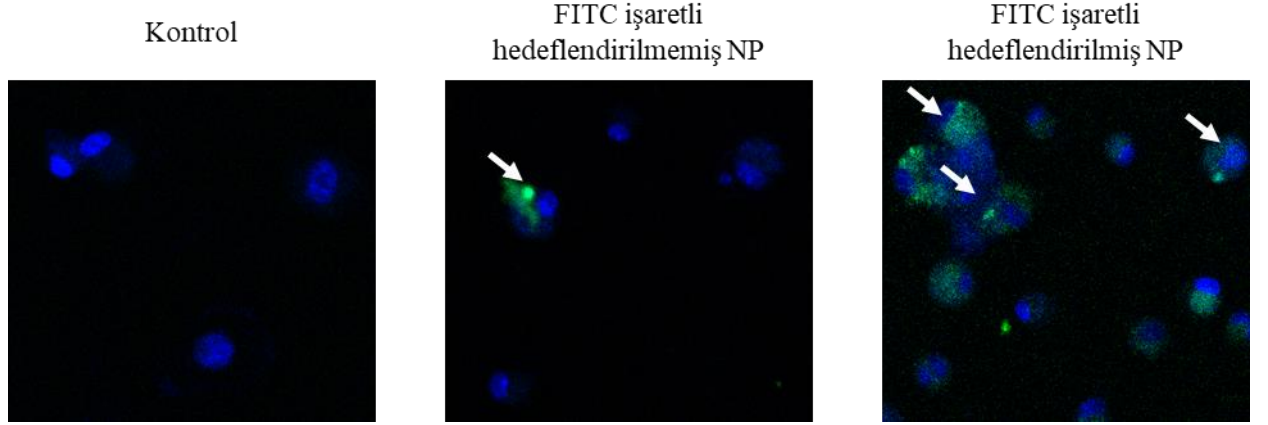


Şekil 6. Akış sitometrisi ile makrofaj hücrelerinin farklılaşmasını gösteren histogram grafikleri.

6.2. Nanopartikül Birikimi Sonuçları

Makrofaj hücrelerinde 24 saat boyunca FITC ile işaretlenmiş hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş NP uygulamaları sonrasında konfokal mikroskopi ile görüntüler elde edildi.

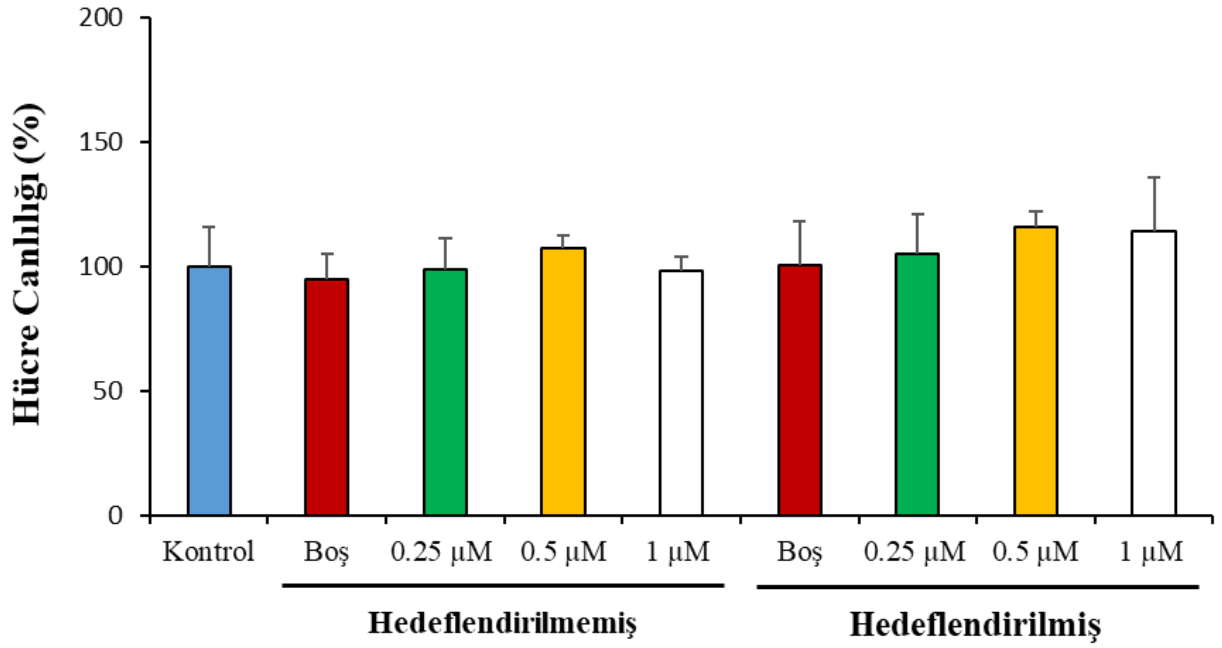
Bu görüntülerde mavi renk (DAPI) makrofaj hücrelerine ait çekirdekleri, yeşil renk ise hücre içerisinde bulunan FITC ile işaretli NP'leri temsil etmektedir. Makrofajlar tarafından alınan NP'lerin bulunduğu bölgeler beyaz oklarla belirtilmektedir (Şekil 7). Sonuç olarak NP birikimi deneyleri ile her deney grubu kendi içinde değerlendirildiğinde FITC işaretlenmiş hedeflendirilmiş NP'lerin, FITC işaretlenmiş hedeflendirilmemiş NP'lere göre makrofaj hücreleri ile etkileşimlerinde daha fazla birikim yaptığı görüldü.



Şekil 7. Konfokal mikroskobunda NP birikimi sonuçlarının gözlemlenmesi.

6.3. Hücre Canlılığı Sonuçları

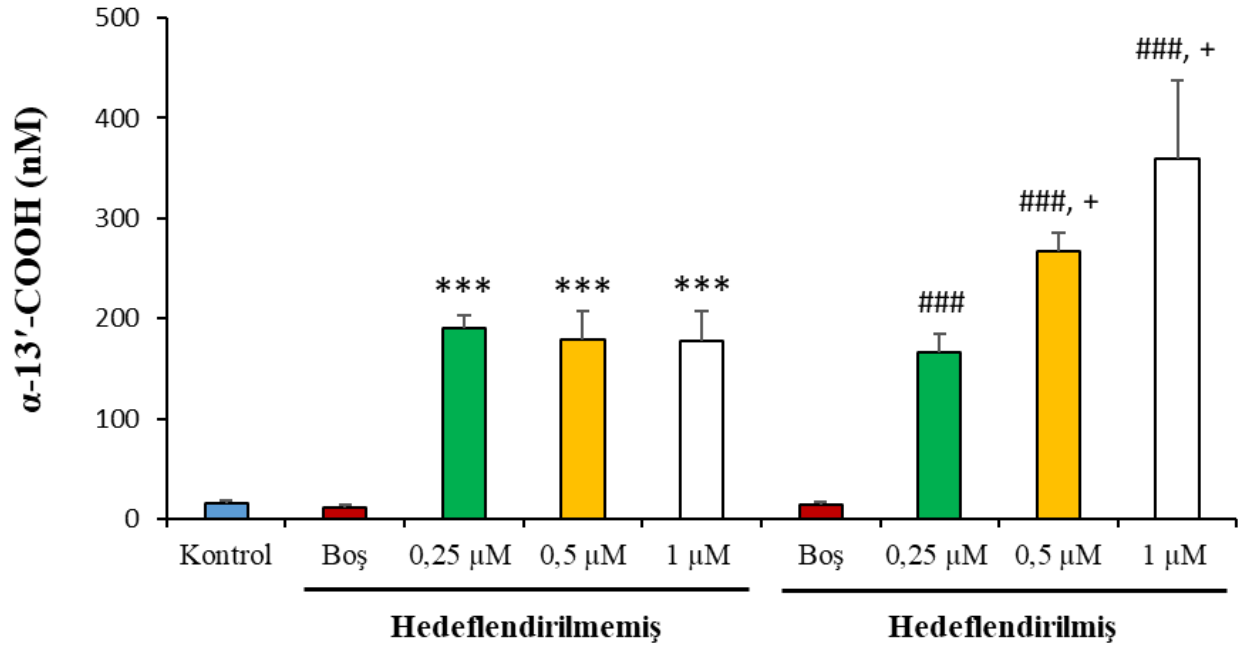
Makrofaj hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda 24 saat boyunca boş hedeflendirilmemiş, α -13'-COOH yüklü hedeflendirilmemiş, boş hedeflendirilmiş ve α -13'-COOH yüklü hedeflendirilmiş NP uygulanmasını takiben, hücre canlılığı MTT testi kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen veriler, uygulanan farklı gruplar arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını göstermektedir ($p > 0,05$). Hücre canlılığı sonuçları, her bir deney grubu için üç tekrarlı ölçümden elde edilen ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile ifade edilmektedir ($n = 3$). Bulgular, farklı NP uygulamalarının hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığını ortaya koymaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. Makrofaj hücrelerinde 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda 13'-COOH yüklü nanopartikül uygulamaları sonrası MTT testi ile elde edilen hücre canlılığı değerleri. $p>0,05$, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=3).

6.4. LC-MS/MS ile α -13'-COOH Düzeyi Sonuçları

Makrofaj hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda 24 saat boyunca hedeflendirilmemiş NP'lerden boş ve α -13'-COOH yüklü ayrıca hedeflendirilmiş boş ve α -13'-COOH yüklü hedeflendirilmiş NP uygulamaları sonrası α -13'-COOH düzeyleri LC-MS/MS ile değerlendirildi (Şekil 9). Hedeflendirilmemiş NP grupları incelendiğinde, 0,25 μ M, 0,5 μ M ve 1 μ M konsantrasyonlarında uygulanan NP'lerin, boş NP grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği görüldü. Benzer şekilde, hedeflendirilmiş NP gruplarında yapılan analizlerde, 0,25 μ M, 0,5 μ M ve 1 μ M konsantrasyonlarının, boş NP grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek α -13'-COOH düzeylerine yol açtığı tespit edildi. Ayrıca, hedeflendirilmiş NP grupları arasında yapılan karşılaştırmalarda, hedeflendirilmiş 0,25 μ M grubuna kıyasla 0,5 μ M ve 1 μ M konsantrasyonlarının istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği gözlemlendi. Bu sonuçlar her iki tip NP'ün α -13'-COOH seviyelerini artırıcı etkisinin konsantrasyona bağlı olarak değiştiğini ve özellikle hedeflendirilmiş NP'lerde yüksek konsantrasyonların anlamlı bir artış sağladığını göstermektedir.



Şekil 9. Makrofaj hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda α -13'-COOH yüklenmiş hedeflendirilmemiş ve hedeflendirilmiş NP uygulamaları sonrası α -13'-COOH düzeyinin LC- MS/MS ile değerlendirilmesi

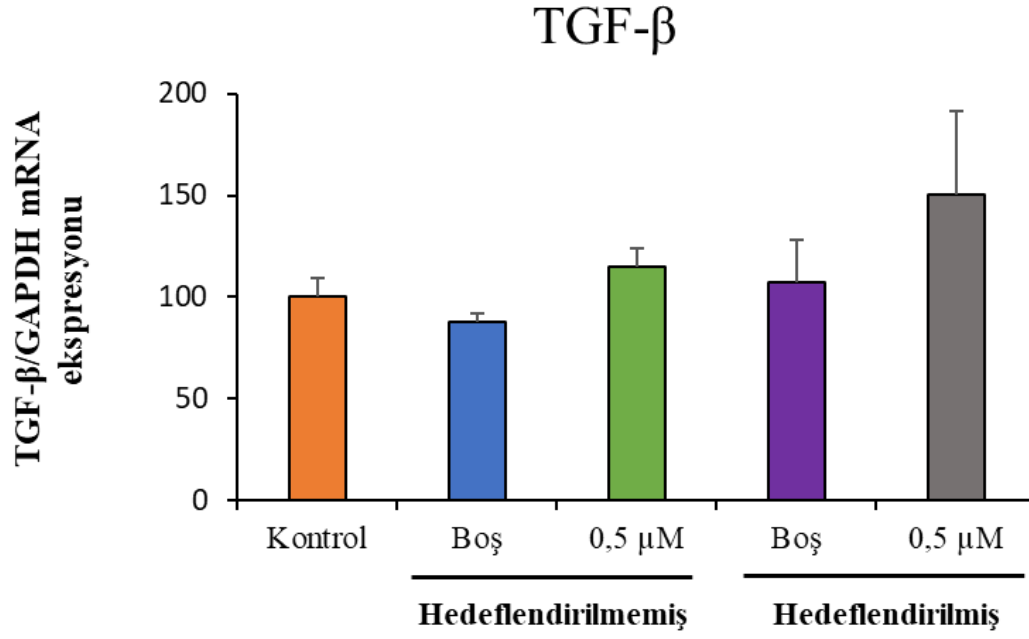
*** $p < 0,001$, Hedeflendirilmemiş boş

$p < 0,001$, Hedeflendirilmiş boş

+ $p < 0,05$ Hedeflendirilmiş 0,25 µM ile kıyaslandığında, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=3)

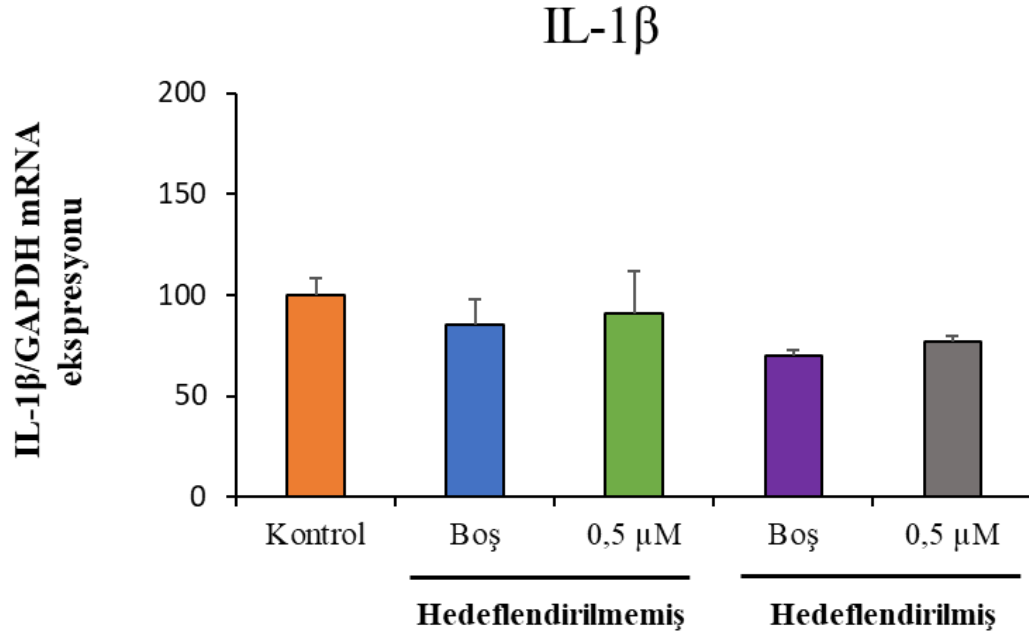
6.5. İnflamasyonla İlişkili Sitokinlerin mRNA Ekspresyon Sonuçları

Makrofaj hücrelerine, 24 saat boyunca boş ve 0,5 µM α -13'-COOH yüklü hedeflendirilmemiş ve hedeflendirilmiş NP uygulandı. TGF- β mRNA düzeyleri belirlendi. Normalizasyon için GAPDH referans geni kullanıldı ve kontrol grubu %100 alınarak gruplar değerlendirildi. TGF- β mRNA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 10) .



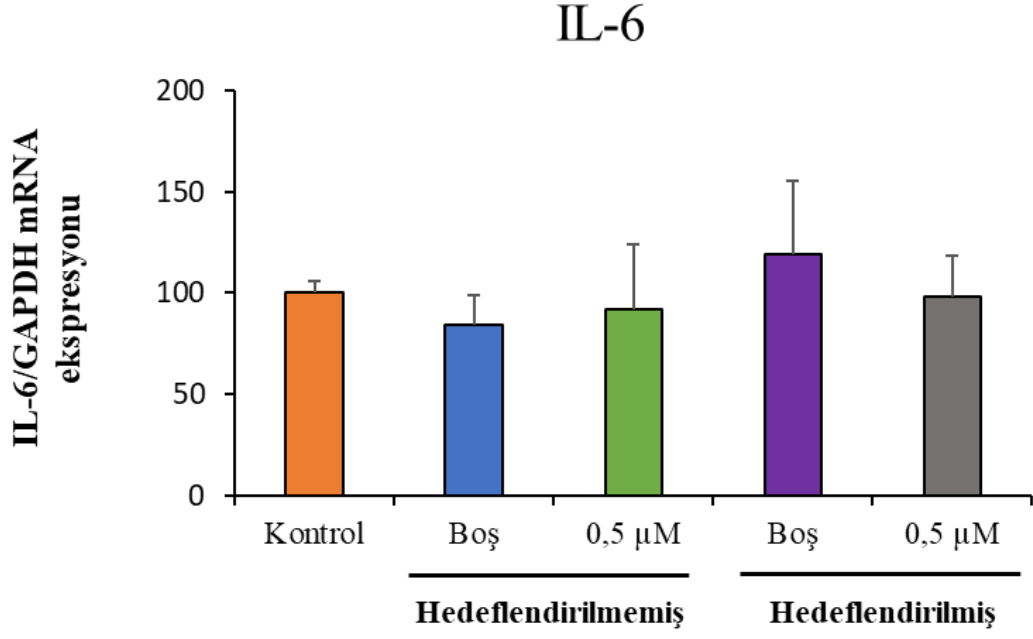
Şekil 10. Makrofaj hücrelerinde 24 saat boyunca boş ve 0,5 μ M α -13'-COOH yüklenmiş hedeflendirilmemiş ve hedeflendirilmiş NP uygulamaları sonrası TGF- β mRNA ekspresyonunun, qRT-PCR ile değerlendirilmesi. $p>0,05$, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=3)

Makrofaj hücrelerinde, 24 saat boyunca boş ve 0,5 μ m α -13'-COOH yüklü hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş NP uygulandıktan sonra IL-1 β mRNA ekspresyon düzeyleri, qRT-PCR yöntemi kullanılarak detaylı bir şekilde değerlendirildi (Şekil 11). Elde edilen veriler ile farklı gruplar arasında IL-1 β mRNA ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını ortaya koyuldu.



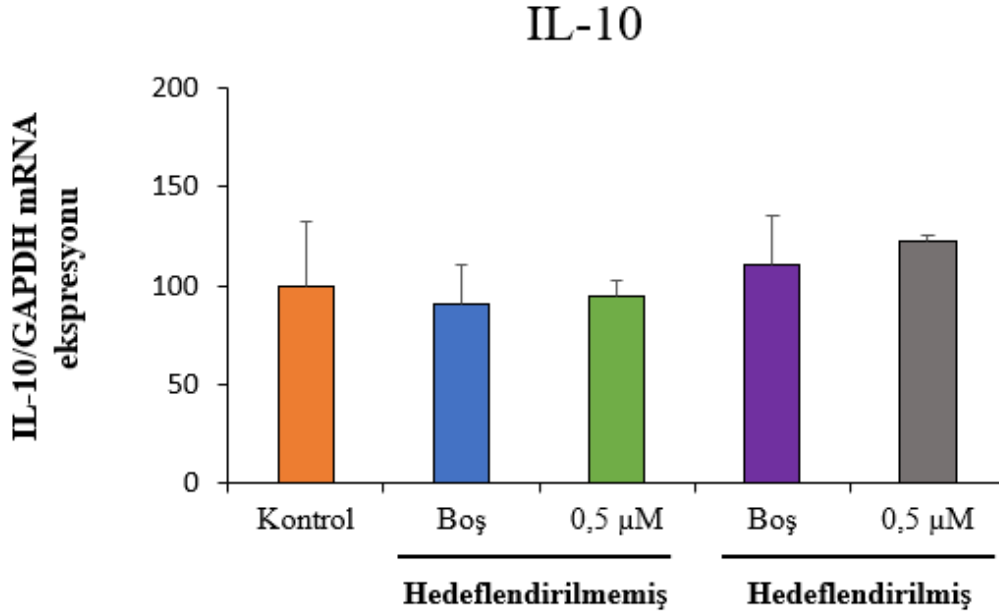
Şekil 11. Makrofaj hücrelerinde 24 saat boyunca boş ve 0,5 μ M α -13'-COOH yüklenmiş hedeflendirilmemiş ve hedeflendirilmiş NP uygulamaları sonrası IL-1 β mRNA ekspresyonunun RT-PCR ile değerlendirilmesi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. $p > 0.05$. ortalama $\pm$ standart sapma, (n=3)

Makrofaj hücrelerinde, 24 saat boyunca boş ve 0,5 μ M α -13'-COOH yüklü hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş NP uygulanmasını takiben, IL-6 mRNA ekspresyon düzeyleri, qRT-PCR yöntemi kullanılarak kapsamlı bir şekilde analiz edildi (Şekil 12). Elde edilen sonuçlar, farklı gruplar arasında IL-6 mRNA ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını gösterdi.



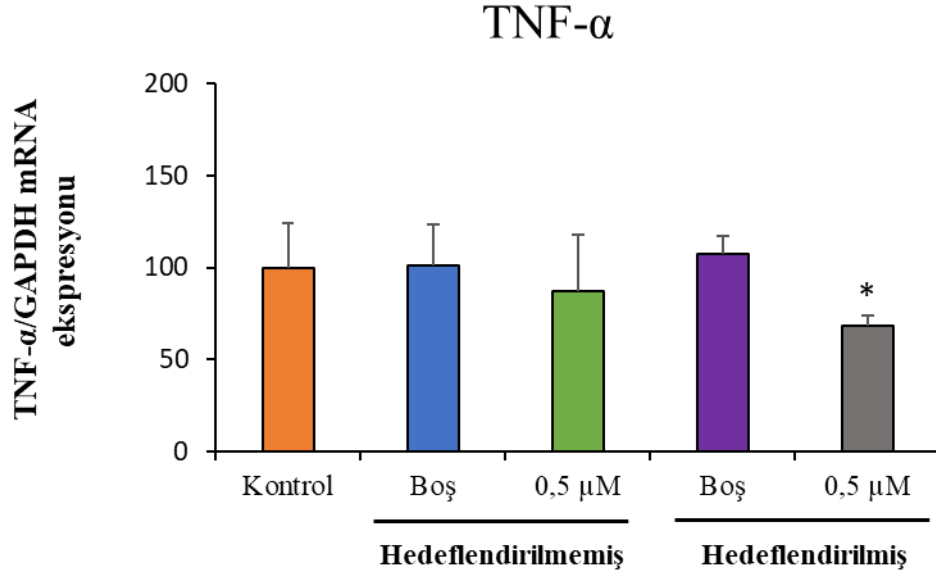
Şekil 12. Makrofaj hücrelerinde 24 saat boyunca boş ve 0,5 µM α -13'-COOH yüklenmiş hedeflendirilmemiş ve hedeflendirilmiş NP uygulamaları sonrası IL-6 mRNA ekspresyonunun RT-PCR ile değerlendirilmesi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. $p>0,05$, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=3).

Makrofaj hücrelerinde, 24 saat boyunca boş ve 0,5 µM α -13'-COOH yüklü hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş NP uygulanmasını takiben, IL-10 mRNA ekspresyon düzeyleri, qRT-PCR yöntemi kullanılarak kapsamlı bir şekilde analiz edildi (Şekil 13). Elde edilen sonuçlar, farklı gruplar arasında IL-10 mRNA ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını gösterdi.



Şekil 13. Makrofaj hücrelerinde 24 saat boyunca boş ve 0,5 μM $\alpha\text{-13'-COOH}$ yüklenmiş hedeflendirilmemiş ve hedeflendirilmiş NP uygulamaları sonrası IL-10 mRNA ekspresyonunun RT-PCR ile değerlendirilmesi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. $p>0,05$, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=3).

Makrofaj hücrelerinde, 24 saat boyunca boş ve 0,5 μM $\alpha\text{-13'-COOH}$ yüklü hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş NP uygulanmasını takiben, TNF- α mRNA ekspresyon düzeyleri, qRT-PCR yöntemi ile değerlendirildi (Şekil 14). Hedeflendirilmiş NP grupları incelendiğinde, 0,5 μM $\alpha\text{-13'-COOH}$ yüklü grubun, hedeflendirilmiş boş NP grubuna kıyasla TNF- α mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği tespit edildi. Bu sonuçlar ile hedeflendirilmiş 0,5 μM $\alpha\text{-13'-COOH}$ yüklü NP'lerin makrofaj hücrelerinde TNF- α mRNA ekspresyonunun baskılayıcı bir etki gösterebildiği ve bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ortaya koyuldu.



Şekil 14. Makrofaj hücrelerinde 24 saat boyunca boş ve 0,5 μ M α -13'-COOH yüklenmiş hedeflendirilmemiş ve hedeflendirilmiş NP uygulamaları sonrası TNF- α mRNA ekspresyonunun RT-PCR ile değerlendirilmesi. Hedeflendirilmiş NP grupları değerlendirildiğinde 0,5 μ M grubunda boş NP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. * $p < 0,05$, Hedeflendirilmiş boş ile kıyaslandığında, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=3).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Vitamin E, 1922 yılında Herbert Evans ve Katherine Bishop tarafından “factor X” adı altında keşfedildikten sonra 1924 yılında, üreme için diyet gereksinimlerini yoğun bir şekilde araştıran Barnett Sure tarafından vitamin E olarak adlandırıldı. Buğday tohumu yağından vitamin E izole eden Evans ve çalışma arkadaşlarını iki yıl sonra Erhard Fernholz kimyasal yapısını önererek takip etti. Fernholz tarafından önerilen bu yapı Paul Karrer ve arkadaşları tarafından kimyasal sentezle doğrulandı (Brigeliuss-Flohe, 2021).

Bahsedilen durumdan tek bir kimyasal yapıya sahip olduğu anlamı çıksa da aslında vitamin E bilinen sekiz farklı molekülün genel adıdır. Bu moleküller iki ana grupta incelenmektedir; tokoferoller ve tokotrienoller. Tokoferoller, farklı şekilde ikame edilmiş bir 6-hidroksi kroman halkası ve fotosentetik bitkilerin biyosentezinde fitil-difosfattan türetilen 16 C atomundan oluşan özdeş bir prenil yan zinciri içermektedir. Homolog tokotrienoller aynı kromanol halkasına sahiptir ancak yan zincirleri 3 çift bağ içermektedir (Sozen ve ark, 2019; Brigeliuss-Flohe, 2021).

Vitamin E'nin uzun zincirli metabolitleri, özellikle α -13'-COOH ve α -13'-OH, son yıllarda yapılan araştırmalarda biyolojik aktivite açısından dikkat çekmektedir. Bu metabolitler, α -tokoferolün karaciğerde sitokrom P450 enzimleri (CYP3A4 ve CYP4F2) tarafından metabolize edilmesiyle oluşmaktadır. Yan zincir hidroksilasyonu ve oksidasyonu ile başlayan bu süreçte, α -13'-COOH gibi aktif metabolitler oluşmaktadır ve bu metabolitler, α -tokoferolden bağımsız etkiler gösterebilmektedir (Wallert ve ark, 2014; Wallert ve ark., 2015).

Uzun zincirli bu metabolitler, antioksidan özelliklerin ötesinde, inflamatuvar süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. α -13'-COOH, özellikle inflamatuvar yanıtın merkezi hücrelerinden biri olan makrofajlar üzerinde belirli etkiler göstermektedir. RAW264.7 makrofajları üzerinde yapılan çalışmalar, α -13'-COOH'ün, LPS ile aktive edilen proinflamatuvar sitokinlerin (örneğin, IL-1 β ve TNF- α) ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Aynı zamanda, COX-2 ve iNOS gibi inflamatuvar enzimlerin gen ekspresyonunu ve protein seviyelerini baskılamaktadır (Wallert ve ark., 2015).

α -13'-COOH gibi uzun zincirli metabolitlerin, makrofajların inflammatuar süreçlerdeki rollerini değiştirme yeteneğine sahip olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. Bu doğrultuda, α -13'-COOH, LPS ile aktive edilen makrofajlarda NF- κ B sinyal yolunu inhibe ederek proinflammatuar gen ekspresyonunu sınırlandırmaktadır. NF- κ B yolu baskılanmasının, IL-1 β ve TNF- α gibi proinflammatuar sitokinlerin üretiminde azalmaya neden olduğu bilinmektedir ve dolayısıyla α -13'-COOH'ün inflammatuar yanıtın yoğunluğunu azalttığı yorumu yapılabilir (Wallert ve ark., 2014; Wallert ve ark., 2015).

Makrofaj hücreleri, inflammatuar süreçlerdeki rolleri nedeniyle kronik inflamasyonun temel araçları arasında yer almaktadır. Kronik inflamasyon durumunda, M1 makrofajlar aşırı aktivasyon göstererek doku hasarına ve çeşitli hastalıkların (örneğin, ateroskleroz, diyabet, romatoid artrit) ilerlemesine neden olabilmektedir. Buna karşılık, inflamasyonun çözünmesi sürecinde IL-10 ve TGF- β gibi anti-inflammatuar sitokinler salgılayan M2 makrofajlar, proinflammatuar yanıtları baskılayarak doku onarımını teşvik etmektedir. Ayrıca, efferositoz sırasında üretilen anti-inflammatuar moleküller, inflamasyonun sonlanmasına katkıda bulunmaktadır (Serhan ve Savill, 2005). Bu mekanizmalar, makrofajların yalnızca inflamasyonu başlatan hücreler değil, aynı zamanda bu süreci kontrol eden ve çözülmesini sağlayan kritik düzenleyiciler olduğunu ortaya koymaktadır.

α -13'-COOH'ün klinik uygulamalardaki etkinliği, hızlı metabolize edilmesi ve plazmada düşük nanomolar konsantrasyonlarda tespit edilmesi nedeniyle ciddi şekilde kısıtlanmaktadır. Giusepponi ve ark. (2017) ile Ciffolilli ve ark. (2015)'nin çalışmalarında, α -13'-COOH'ün karaciğer dışı dokulara yeterli düzeyde iletilememesi, biyoyararlanımını sınırlandıran temel bir faktör olarak tanımlanmıştır. Bu durum, α -13'-COOH'ün tedaviye yönelik etkilerini arttırmak için yenilikçi taşıma stratejilerinin geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Nanopartiküller, taşıdıkları bileşikler gastrointestinal sistemdeki bozunmalara karşı koruma, sistemik dolaşımda daha uzun süre kalabilme ve hedef dokulara spesifik olarak yönlendirilme gibi özellikleriyle modern biyoteknolojide ilaç taşıma sistemleri için ideal araçlar olarak öne çıkmaktadır. Chen ve ark. (2016) ile Khalil ve ark. (2013)'ün araştırmaları, NP'lerin taşıdıkları moleküllerin kontrollü salınımını sağlayarak farmakokinetik özellikleri iyileştirdiğini ve ilaçların biyoyararlanımını artırdığını göstermektedir. Bu taşıma sistemleri, α -13'-COOH gibi

düşük stabiliteye sahip bileşiklerin hedef bölgelere etkili bir şekilde iletilmesi ve sistemik dolaşımdaki yarı ömrünün uzatılması açısından büyük bir avantaj sunmaktadır.

Nanopartiküllerin bu özellikleri, α -13'-COOH'ün biyoyararlanımını artırmak ve iyileştirici etkilerini arttırmak için umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Kontrollü salınım mekanizmaları, bileşiğin metabolik yıkımını yavaşlatabilirken, hedef dokulara yönlendirme kapasitesi, karaciğer dışı dokulara daha etkili bir şekilde iletilmesini sağlayabilir. Bu bağlamda, α -13'-COOH'ün nanopartiküller aracılığıyla taşınması, yalnızca biyoyararlanımını artırmakla kalmayıp, aynı zamanda inflamasyon gibi kronik süreçlerle ilişkili hastalıkların tedavisinde daha etkili bir araç olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Bu veriler, NP bazlı taşıma sistemlerinin farmasötik alanındaki yenilikçi kullanım potansiyelini bir kez daha vurgulamaktadır.

Bu tez çalışmasında, literatürde anti-inflamatuar özellikleri detaylı bir şekilde ortaya konmuş olan α -13'-COOH metabolitinin, makrofaj hücrelerine spesifik olarak hedeflenmiş NP sistemleri içerisine yüklenmesi yoluyla makrofaj hücreleriyle etkileşiminin artırılması hedeflendirildi. Bu yaklaşım, α -13'-COOH'ün düşük stabilite ve hızlı metabolize olma gibi dezavantajlarını aşmayı, aynı zamanda hedef makrofaj hücrelerinde inflamasyonun düzenlenmesine yönelik etkisini artırmayı hedefledi. Nanopartikül bazlı taşıma sistemlerinin, hem α -13'-COOH'ün biyoyararlanımını arttıracığı hem de inflamatuvar süreçlerdeki düzenleyici etkilerini indükleyeceği düşünüldü.

Çalışmada, α -13'-COOH'ün makrofaj hücrelerine etkili bir şekilde iletilmesini sağlamak amacıyla Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen "Anti-İnflamatuar İlaç İçeren ve Hedefli PLGA Nanoparçacıkların Hazırlanması ve *In Vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı tez çalışmasında hazırlanan NP'ler kullanıldı. Hazırlanan NP'lerin makrofaj hücreleri ile etkileşimi *in vitro* olarak incelendi ve bu doğrultuda, fare kemik iliği hücrelerinden farklılaştırılmış primer makrofaj hücreleri kullanıldı. Primer hücre hatları, ticari olarak satın alınan hücre hatlarına kıyasla genetik ve fenotipik farklılıklar göstermekte ve *in vivo* heterojen yapıları nedeniyle biyolojik süreçleri daha doğru bir şekilde yansıtmaktadır. Literatürde, ticari hücre hatlarından elde edilen sonuçların primer hücre hatlarından elde edilen sonuçlarla farklılık gösterebileceği bildirilmiştir (Andreu ve ark., 2017; Maurya ve ark., 2013). Ayrıca, yüksek etki faktörlü yayınlarda, ticari hücre hatları yerine

kemik iliğinden farklılaştırılmış makrofajların sıklıkla tercih edilmektedir (Cai ve ark., 2017; Wang ve ark., 2017). Bu bağlamda, bu tez çalışmasında primer makrofaj hücrelerinin tercih edilmesi, literatür ile uyumlu sonuçlar elde edilmesine katkı sağladı.

Çalışmada, farklı konsantrasyonlarda α -13'-COOH yüklenmiş NP'lerin makrofajlar üzerindeki etkileri değerlendirildi ve literatüre paralel olarak (Tao ve ark., 2022), bu NP'lerin hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı belirlendi. Hücre içi NP birikimi konfokal mikroskopi ile, α -13'-COOH düzeyleri ise LC-MS/MS yöntemi ile belirlendi. Boş NP uygulanan gruplara kıyasla, hem hedeflendirilmemiş hem de hedeflendirilmiş NP gruplarında NP birikimi ve α -13'-COOH düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlendi. Bununla birlikte, hedeflendirilmiş NP uygulanan gruplarda, hedeflendirilmemiş NP gruplarına kıyasla daha fazla NP birikimi ve konsantrasyona bağlı olarak α -13'-COOH düzeylerinde daha belirgin artış saptandı. Bu sonuçlar, hedeflendirilmiş NP'lerin makrofajlar tarafından daha etkin bir şekilde alındığını ve α -13'-COOH'ün hedef hücrelere taşınmasında hedeflendirme stratejisinin başarılı bir yaklaşım olduğunu doğruladı.

Ayrıca bu tez çalışmasında α -13'-COOH yüklü NP'lerin inflamasyon üzerindeki etkinliğini belirlemek amacıyla, primer makrofaj hücrelerinde TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-6 ve IL-1 β sitokinlerinin mRNA düzeyleri belirlendi. TNF- α , inflamatuvar süreçlerin hızla başlamasında kritik rol oynayan bir sitokindir ve NF- κ B sinyal yolunu aktive ederek proinflamatuvar genlerin ekspresyonunu artırmaktadır (Horiuchi ve ark., 2010; Hayden & Gosh, 2014). TGF- β , inflamasyonun çözülmesi aşamasında Smad sinyal yolları aracılığıyla anti-inflamatuvar genlerin ekspresyonunu artıran ve makrofajların M2 fenotipine farklılaşmasını teşvik eden bir düzenleyici görevini görmektedir (Sanjabi ve ark., 2017). IL-10'un, proinflamatuvar bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu baskılayarak NF- κ B sinyal yolunu inhibe eden ve inflamasyonun kontrol altına alınmasında önemli bir rol oynayan bir anti-inflamatuvar sitokin olduğu bilinmektedir (Ouyang & O'Garra, 2019). IL-6, akut faz yanıtını tetikleyen ve JAK/STAT3 yolları aracılığıyla hematopoetik süreçlerin düzenlenmesine katkıda bulunan bir mediatördür (Ngwa ve ark., 2022). Son olarak, IL-1 β , COX-2 aktivasyonu yoluyla prostaglandin E2 sentezini artırarak ateşi yükselten ve inflamatuvar yanıtın amplifikasyonunda görev alan bir proinflamatuvar sitokin olarak bu analizlerde yer almaktadır (Neeb ve ark., 2011; Slaats ve ark., 2016). Bu sitokinlerin her biri, α -13'-COOH yüklü NP'lerin inflamatuvar süreçleri nasıl

etkilediğini anlamak için kilit parametreler olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda TGF- β , IL-10, IL-6 ve IL-1 β düzeylerinde anlamlı farklılar görülmedi ancak NP içerisine yüklenmiş α -13'-COOH uygulaması ile TNF- α ekspresyonunun baskılandığı saptandı.

Nanopartikül bazlı sistemler ve nanoteknolojinin tıbbi uygulamaları (nanotıp), biyomedikal araştırma ve sağlık alanında hızla gelişen bir disiplindir (Kamaly ve ark., 2012; Kumari ve ark., 2010). Bu küçük parçacıklar, çeşitli terapötik ajanlar ve teşhis araçları için taşıyıcı sistemler olarak görev yapmakta ve kapsülledikleri farmasötik bileşikleri zorlu fizyolojik koşullardan koruma, dolaşım süresini uzatma, spesifik doku ve hücrelere hedefleme ve kontrollü salınım gibi önemli avantajlar sunmaktadır. NP bazlı sistemlerin en umut verici yönlerinden biri, biyoyararlanımını artırma potansiyelidir. Bu artan biyoyararlanım, daha düşük dozlarla daha etkili tedavilerin sağlanmasına olanak tanırken, olası yan etkileri de azaltabilmektedir.

Anti-inflamatuar etkileri çeşitli hücre kültürü ve hayvan modellerinde gösterilmiş olan α -13'-COOH molekülü, NP sistemlerine entegre edilmiş şekilde kullanılmıştır. α -13'-COOH, S2P peptidi ile konjüge edilerek makrofajlara spesifik bir hedefleme stratejisi Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen "Anti-İnflamatuar İlaç İçeren ve Hedefli PLGA Nanoparçacıkların Hazırlanması ve *In Vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı çalışma ile geliştirilmiştir. Kemik iliği hücrelerinden farklılaştırılan makrofajlarda gerçekleştirilen *in vitro* deneylerde, α -13'-COOH yüklü NP'lerin hücre canlılığını etkilemeden makrofaj hücrelerinde biriktiği, α -13'-COOH seviyelerinde artış sağladığı ve pro-inflamatuar bir sitokin olan TNF- α baskılanmasında etkili olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, α -13'-COOH'ün inflamasyon süreçlerini modüle etme ve hedefli ilaç taşıma sistemlerinin tedaviye yönelik potansiyelini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, α -13'-COOH'ün inflamasyon süreçlerini modüle etme ve hedefli ilaç taşıma sistemlerinin tedaviye yönelik potansiyelini ortaya koymakla birlikte, bu molekülün klinik uygulamalarda kullanılabilirliğinin değerlendirilebilmesi için ileri *in vivo* çalışmaların ve klinik araştırmaların gerekliliğini vurgulamaktadır.

8. KAYNAKLAR

- Aksoz, E., Korkut, O., Aksit, D., & Gokbulut, C. (2020). Vitamin E (α -, β + γ - and δ -tocopherol) levels in plant oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 35(5), 504–510. <https://doi.org/10.1002/ffj.3585>
- Andreu, N., Phelan, J., de Sessions, P. F., Cliff, J. M., Clark, T. G., & Hibberd, M. L. (2017). Primary macrophages and J774 cells respond differently to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports*, 7(1), 42225. <https://doi.org/10.1038/srep42225>
- Arai, H., & Kono, N. (2021). α -Tocopherol transfer protein (α -TTP). *Free Radical Biology and Medicine*, 176, 162–175. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.09.021>
- Azzi, A. (2021). Reflections on a century of vitamin E research: Looking at the past with an eye on the future. *Free Radical Biology and Medicine*, 175, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.042>
- Bartolini, D., Marinelli, R., Giusepponi, D., Galarini, R., Barola, C., Stabile, A. M., Sebastiani, B., Paoletti, F., Betti, M., Rende, M., & Galli, F. (2021). Alpha-tocopherol metabolites (the vitamin e metabolome) and their interindividual variability during supplementation. *Antioxidants*, 10(2), 173. <https://doi.org/10.3390/antiox10020173>
- Bell, E. F. (1987). History of vitamin E in infant nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 46(1), 183–186. <https://doi.org/10.1093/ajcn/46.1.183>
- Birringer, M., & Lorkowski, S. (2018). Vitamin E: Regulatory role of metabolites. *IUBMB Life*, 71(4), 479–486. <https://doi.org/10.1002/iub.1988>
- Brigelius-Flohé, R. (2021). Vitamin E research: Past, now and future. *Free Radical Biology and Medicine*, 177, 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.10.029>
- Cai, B., Dongiovanni, P., Corey, K. E., Wang, X., Shmarakov, I. O., Zheng, Z., Kasikara, C., Davra, V., Meroni, M., Chung, R. T., Rothlin, C. V., Schwabe, R. F., Blaner, W. S., Birge, R. B., Valenti, L., & Tabas, I. (2019). Macrophage MerTK promotes liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Metabolism*, 31(2), 406–421.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.013>
- Chen, J., Guo, Z., Tian, H., & Chen, X. (2016). Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development*, 3, 16023. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.23>
- Ciffolilli, S., Wallert, M., Bartolini, D., Krauth, V., Werz, O., Piroddi, M., Sebastiani, B., Torquato, P., Lorkowski, S., Birringer, M., & Galli, F. (2015). Human serum determination and in vitro anti-inflammatory activity of the vitamin E metabolite α -(13'-hydroxy)-6-hydroxychroman. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 952–962. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.019>

- Douglas, C. E., Chan, A. C., & Choy, P. C. (1986). Vitamin E inhibits platelet phospholipase A2. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 876(3), 639–645. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(86\)90053-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(86)90053-6)
- Fujiwara, N., & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*, 4(3), 281–286. <https://doi.org/10.2174/1568010054022024>
- Galli, F., Azzi, A., Birringer, M., Cook-Mills, J. M., Eggersdorfer, M., Frank, J., Cruciani, G., Lorkowski, S., & Özer, N. K. (2016). Vitamin E: Emerging aspects and new directions. *Free Radical Biology and Medicine*, 102, 16–36. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.017>
- Giusepponi, D., Torquato, P., Bartolini, D., Piroddi, M., Birringer, M., Lorkowski, S., Libetta, C., Cruciani, G., Moretti, S., Saluti, G., Galli, F., & Galarini, R. (2017). Determination of tocopherols and their metabolites by liquid-chromatography coupled with tandem mass spectrometry in human plasma and serum. *Talanta*, 170, 552–561. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.030>
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2014). Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Seminars in Immunology*, 26(3), 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.05.004>
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF- α : Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Lara D. Veeken*, 49(7), 1215–1228. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031>
- Jiang, Q. (2021). Metabolism of natural forms of vitamin E and biological actions of vitamin E metabolites. *Free Radical Biology and Medicine*, 179, 375–387. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.11.012>
- Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., Radovic-Moreno, A. F., & Farokhzad, O. C. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: Design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2971. <https://doi.org/10.1039/c2cs15344k>
- Khalil, K. A., Fouad, H., Elsarnagawy, T., & Almajhdi, F. N. (2013). Preparation and characterization of electrospun PLGA/silver composite nanofibers for biomedical applications. *International Journal of Electrochemical Science*, 8(3), 3483–3493. [https://doi.org/10.1016/s1452-3981\(23\)14406-3](https://doi.org/10.1016/s1452-3981(23)14406-3)
- Kluge, S., Schubert, M., Börmel, L., & Lorkowski, S. (2021). The vitamin E long-chain metabolite α -13'-COOH affects macrophage foam cell formation via modulation of the lipoprotein lipase system. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1866(4), 158875. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.158875>
- Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2009). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 75(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>
- Liao, S., Gollowitzer, A., Börmel, L., Maier, C., Gottschalk, L., Werz, O., Wallert, M., Koeberle, A., & Lorkowski, S. (2023). A-Tocopherol-13'-Carboxychromanol induces cell cycle arrest and cell death by inhibiting the SREBP1-SCD1 axis and causing imbalance in lipid desaturation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9229. <https://doi.org/10.3390/ijms24119229>

- Lienau, A., Glaser, T., Krucker, M., Zeeb, D., Ley, F., Curro, F., & Albert, K. (2002). Qualitative and quantitative analysis of tocopherols in toothpastes and gingival tissue employing HPLC NMR and HPLC MS coupling. *Analytical Chemistry*, 74(20), 5192–5198. <https://doi.org/10.1021/ac020316k>
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Maurya, M. R., Gupta, S., Li, X., Fahy, E., Dinasarapu, A. R., Sud, M., Brown, H. A., Glass, C. K., Murphy, R. C., Russell, D. W., Dennis, E. A., & Subramaniam, S. (2013). Analysis of inflammatory and lipid metabolic networks across RAW264.7 and thioglycolate-elicited macrophages. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2525–2542. <https://doi.org/10.1194/jlr.m040212>
- Neeb, L., Hellen, P., Boehnke, C., Hoffmann, J., Schuh-Hofer, S., Dirnagl, U., & Reuter, U. (2011). IL-1B stimulates COX-2 dependent PGE2 synthesis and CGRP release in rat trigeminal ganglia cells. *PLoS ONE*, 6(3), e17360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017360>
- Ngwa, D. N., Pathak, A., & Agrawal, A. (2022). IL-6 regulates induction of C-reactive protein gene expression by activating STAT3 isoforms. *Molecular Immunology*, 146, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.04.003>
- Ouyang, W., & O'Garra, A. (2019). IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: From basic science to clinical translation. *Immunity*, 50(4), 871–891. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>
- Riedl, R., Wallert, M., Lorkowski, S., & Wiegand, C. (2023). Effects of histamine and the α -tocopherol metabolite α -13'-COOH in an atopic dermatitis full-thickness skin model. *Molecules*, 28(1), 440. <https://doi.org/10.3390/molecules28010440>
- Sanjabi, S., Oh, S. A., & Li, M. O. (2017). Regulation of the immune response by TGF-B: From conception to autoimmunity and infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(6), a022236. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022236>
- Schmölz, L., Wallert, M., Cifollilli, S., Kluge, S., Cruciani, G., Glei, M., Werz, O., Galli, F., Birringer, M., & Lorkowski, S. (2016). Long-chain metabolites of α -tocopherol emerge from the shadow of their precursors: A-13'-OH and A-13'-COOH as a new class of regulatory metabolites. *Atherosclerosis*, 252, e209. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.148>
- Schubert, M., Kluge, S., Brunner, E., Pace, S., Birringer, M., Werz, O., & Lorkowski, S. (2021). The α -tocopherol-derived long-chain metabolite α -13'-COOH mediates endotoxin tolerance and modulates the inflammatory response via MAPK and NF κ B pathways. *Free Radical Biology and Medicine*, 178, 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.11.032>
- Sen, C. K., Khanna, S., & Roy, S. (2006). Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Sciences*, 78(18), 2088–2098. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.001>

- Serhan, C. N., & Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: The beginning programs the end. *Nature Immunology*, 6(12), 1191–1197. <https://doi.org/10.1038/ni1276>
- Singh, R., & Lillard, J. W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, 86(3), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>
- Slaats, J., Oever, J. T., Van De Veerdonk, F. L., & Netea, M. G. (2016). IL-1 β /IL-6/CRP and IL-18/ferritin: Distinct inflammatory programs in infections. *PLoS Pathogens*, 12(12), e1005973. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005973>
- Sozen, E., Demirel, T., & Ozer, N. K. (2019). Vitamin E: Regulatory role in the cardiovascular system. *IUBMB Life*, 71(4), 507–515. <https://doi.org/10.1002/iub.2020>
- Steen, E. H., Wang, X., Balaji, S., Butte, M. J., Bollyky, P. L., & Keswani, S. G. (2019). The role of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in tissue fibrosis. *Advances in Wound Care*, 9(4), 184–198. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.1032>
- Şentürk, N. (2013). Kütanöz inflamasyon. *TURKDERM*, 47(1), 28–36. <https://doi.org/10.4274/turkderm.47.s5>
- Tao, W., Yurdagul, A., Kong, N., Li, W., Wang, X., Doran, A. C., Feng, C., Wang, J., Islam, M. A., Farokhzad, O. C., Tabas, I., & Shi, J. (2020). siRNA nanoparticles targeting CaMKII γ in lesional macrophages improve atherosclerotic plaque stability in mice. *Science Translational Medicine*, 12(553). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay1063>
- Torquato, P., Marinelli, R., Bartolini, D., Giusepponi, D., Cruciani, G., Siragusa, L., Galarini, R., Sebastiani, B., Gioiello, A., & Galli, F. (2019). Vitamin E: Metabolism and molecular aspects. In *Elsevier eBooks* (pp. 487–518). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811907-5.00020-8>
- Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024>
- Wallert, M., Mosig, S., Rennert, K., Funke, H., Ristow, M., Pellegrino, R. M., Cruciani, G., Galli, F., Lorkowski, S., & Birringer, M. (2013). Long-chain metabolites of α -tocopherol occur in human serum and inhibit macrophage foam cell formation in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 68, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.009>
- Wallert, M., Schmölz, L., Koeberle, A., Krauth, V., Gleit, M., Galli, F., Werz, O., Birringer, M., & Lorkowski, S. (2015). α -Tocopherol long-chain metabolite α -13'-COOH affects the inflammatory response of lipopolysaccharide-activated murine RAW264.7 macrophages. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(8), 1524–1534. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400737>
- Wang, Y., Lin, Y., Qiao, S., An, H., Ma, Y., Qiao, Z., Rajapaksha, R. Y. J., & Wang, H. (2016). Polymeric nanoparticles promote macrophage reversal from M2 to M1 phenotypes in the tumor microenvironment. *Biomaterials*, 112, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.034>

- Xiao, R., Wang, R., Zeng, Z., Xu, N. L., & Wang, J. (2012). Application of poly(ethylene glycol)– distearoylphosphatidylethanolamine (PEG-DSPE) block copolymers and their derivatives as nanomaterials in drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 4185. <https://doi.org/10.2147/ijn.s34489>
- Xu, Z., Harvey, K. A., Pavlina, T. M., Zaloga, G. P., & Siddiqui, R. A. (2014). Tocopherol and tocotrienol homologs in parenteral lipid emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(1), 15–22. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400182>
- Yih, T., & Al-Fandi, M. (2006). Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(6), 1184–1190. <https://doi.org/10.1002/jcb.20796>

9. ÖZGEÇMİŞ

10.BİLİMSEL FAALİYETLER

11.EKLER

11.1. Etik Kurul Onay Formu