

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİNAPİK ASİT YÜKLÜ POLİMERİK
NANOPARTİKÜLLERİN FİBROBLAST VE GLİOMA
HÜCRE SOYLARI ÜZERİNDE SİTOTOKSİSİTE VE
GENOTOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ**

Fatma Şayan POYRAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Mayıs, 2019

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİNAPİK ASİT YÜKLÜ POLİMERİK
NANOPARTİKÜLLERİN FİBROBLAST VE GLİOMA
HÜCRE SOYLARI ÜZERİNDE SİTOTOKSİSİTE VE
GENOTOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ**

Fatma Şayan POYRAZ tarafından hazırlanan tez çalışması 10.05.2019 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. Banu MANSUROĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Melike ERSÖZ

Demiroğlu Bilim Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “Sinapik Asit Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Fibroblast ve Glioma Hücre Soyları Üzerinde Sitotoksikite ve Genotoksitesinin İncelenmesi” 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

Fatma Şayan POYRAZ

İmza



Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 117Z016 numaralı ve Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FYL-2018-3248 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



Babam'a

TEŞEKKÜR

Tilki'nin de dediği gibi; Ölene kadar sorumlusun gönül bağı kurduğun her şeyden...

Öncelikle bu mesleği yüreğimle hissettiğim ve o uzun, zahmetli yola çıkma kararı aldığım ilk günden beri her daim yanımda olan ve elimden tutan saygıdeğer hocam Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU'na,

Yapamıyorum dediğim her an tecrübesi ile bana yol gösterip cesaret veren ve işime daha da sıkı sarılmamı sağlayan sayın Doç. Dr. Serap DERMAN'a,

Bilgisi ve deneyimi ile çok kısa sürede bütün eksikliklerimi kapatan, her daim örnek alacağım sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ'a,

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerine ve sevgili çalışma arkadaşlarım Hasan DEMİRCİ, Mine KUÇAK, Ahmet YAĞBASAN, Burcu TÜRKÖĞLU ve Munise YURTSEVER'e,

Kültür-Sanat aktivitelerimin vazgeçilmez üyesi, laboratuvarında sabahlamayı hobi haline getirmemi sağlayan sevgili arkadaşım Pınar ÇAĞLAR EYOL'a,

Kahkahalarla güldüğümüz bolca günler ve bir o kadar yorgunluktan ağladıklarımız olsa da uzun çalışma saatlerine birbirimize kenetlenerek katlanabildiğimize inandığım laboratuvar partnerim Gülşah AKBAŞ'a, tüm o yorucu günlerin büyük çoğunluğunu bir arada geçirdiğimiz ve -1'de var olmaya çalışmanın dayanılmaz hafifliğine beraber göğüs gerdiğim sevgili arkadaşlarım Dilsu ÇOLPAN, Sefanur ERDÖL, Sinem KURT, Tuğba ATABEY, Kübra TRABZONLU, Caner ERTÜRK, Akın SUNULU, İlkgül AKMAYAN, Cansel KAYA ve Emrah BERTAN'a,

Berberer büyüyüp tam yollarımız ayrıldı dediğim anda meslektaş olarak birlikte çalışma fırsatı bulduğum biricik arkadaşım Yağmur BOZKURT'a, hayatımın her anında benimle olacaklarına inandığım, ikinci ailem olan kıymetli arkadaşlarım Serap AKTOGAN, Fatma Ceren KIRMIZITAŞ, Edibe Ece ABACI, Elif DİK, Yağmur HASBİOĞLU, Elif Nur YILMAZ, Oğuz Kaan KIRBAŞ, Burçin YAVUZ ve Alper GÜLER'e,

Vicdanlı olmanın her şeyden daha değerli olduğunu bana öğreten Ailem'e, yaşamın getirdiği tüm zorlukları beraber aştığım Annem'e, hiç ama hiç unutmayacağım Babam'a, Fındığıma, adını yazamadığım; belki de unuttuğum tüm sevdiklerime, zamansız geldiği için güzel olan tüm mucizelere,

İnanıldığım ve başardığım için kendime teşekkürü borç bilirim.

Mayıs, 2019

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ.....	10
KISALTIMA LİSTESİ	11
ŞEKİL LİSTESİ.....	13
TABLO LİSTESİ.....	15
ÖZET	16
ABSTRACT.....	19
1 Giriş.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	3
2 GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Kanser.....	4
2.1.1 Kanser Türleri ve Beyin Kanseri.....	5
2.2 Sinapik Asit.....	6
2.1.1 Sinapik asitin Farmakolojik Özellikleri	7
2.1.1.2 Antioksidan Etki.....	8
2.1.1.3 Nöroprotektif Etki.....	10
2.1.1.4 Ankisiyolitik Etki.....	11
2.1.1.5 Kardiyoprotektif Etki	12
2.1.1.6 Antimikrobiyal Etki.....	13
2.1.1.7 Hepatoprotektif Etki	13
2.1.1.8 Antihiperglisemik Etki	14
2.1.1.9 Antikanser Etki	15

2.1.1.10	Sinapik Asit Molekülünün Toksik Etkileri.....	16
2.3	Nanopartiküller	18
2.3.2	Nanopartiküllerde Kontrollü İlaç Salınımı	20
2.3.3	Polimerik Nanopartiküller	20
2.3.4	Poli (laktid-ko-glikolid asit)(PLGA)	21
2.3.5	Nanopartiküller ile Sürfaktanların Etkileşmesi	24
2.3.6	Nanopartikül Üretim Yöntemleri	25
2.4	Nanopartikül Karakterizasyonunda Kullanılan Cihazlar.....	28
2.4.1	UV-Vis Spektrofotometre	28
2.4.2	Zeta Sizer (Parçacık Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçüm Cihazı).....	30
2.4.3	FT-IR.....	31
2.4.4	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	33
2.5	Hücre Kültürü.....	34
2.5.1	L929 Fibroblast Hücre Hattı	35
2.5.2	C6 Glioma Hücre Hattı.....	35
2.5.3	MTT Testi	36
2.5.4	Genotoksisite	36
2.5.5	Comet Assay Testi.....	38
3	MATERYAL - METOD.....	41
3.1	DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	41
3.2	DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar	42
3.3	DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler.....	43
3.3.1	Nanopartikül Hazırlamada Kullanılan Çözeltiler.....	43
3.3.1.1	Farklı Konsantrasyonlarda Sinapik Asit Çözeltisi Hazırlanması	43
3.3.1.2	Polivinilalkol (PVA) Çözeltisi Hazırlanması.....	43
3.3.1.3	0,01 mol/L'lik Fosfat Tamponu (PBS) Hazırlanması (pH=7,4).....	43

3.3.2	Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	44
3.3.2.1	DMEM/F12 Tamamlanmış Besiyeri Hazırlanması	44
3.3.2.2	Hücre Dondurma Solüsyonu Hazırlanması.....	44
3.3.2.3	MTT Solüsyonu Hazırlanması	44
3.3.3	Genotoksisite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	44
3.3.3.1	Agaroz Çözeltilerinin Hazırlanması	44
3.3.3.2	Lizis Çözeltisi Hazırlanması	44
3.3.3.3	Elektroforez Çözeltisi Hazırlanması	45
3.3.3.4	Nötralizasyon Çözeltisi	45
3.3.3.5	Boyama Çözeltisi	45
3.4	DeneySEL MetODLAR	45
3.4.1	Sinapik Asit Molekülünün Kalibrasyon Eğrileri	45
3.4.2	Sinapik Asit Yüklü Nanopartikül Sentezi	46
3.4.3	Sinapik Asit Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	46
3.4.3.1	Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması.....	47
3.4.3.2	Reaksiyon Veriminin Hesaplanması.....	47
3.4.3.3	İlaç Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması.....	47
3.4.4	Hücre Kültürü Çalışmaları	48
4	SONUÇ VE ÖNERİLER	52
4.1	Sinapik Asit Molekülüne Ait UV-Vis Spektrumları ve Kalibrasyon Eğrileri....	52
4.2	Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Parametreler ve Sonuçlar	54
4.3	Optimize Nanopartiküller	62
4.4	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....	66
4.5	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi.....	67
4.6	Optimize Nanopartiküllere Ait <i>In Vitro</i> Salım Değerlerinin İncelenmesi.....	67
4.7	<i>In vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları.....	69

4.8 Sitotoksisite Çalışmaları	70
4.8.1 L929 Fibroblast Hücre Hattında Sitotoksisite Analizi	70
4.8.2 C6 Glioma Hücre Hattında Sitotoksisite Analizi.....	72
4.9 Genotoksisite Çalışmaları	75
4.10 Tartışma ve Öneriler	78
5 KAYNAKÇA.....	85
6 TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR.....	93



SİMGE LİSTESİ

L	Litre
ml	Mililitre
μ l	Mikrolitre
g	Gram
mg	Miligram
μ l	Mikrogram
μ m	Mikrometre
nm	Nanometre
λ	Dalgaboyu
M	Molar
μ M	Mikromolar
n	Mol
$^{\circ}$ C	Derece Santigrat
rpm	Dakikada Dönme Hızı
kV	Kilovolt
mV	Milivolt
W	watt

KISALTMA LİSTESİ

ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Attenuated Total Reflectance
DCM	Diklorometan
DL	Drug Loading
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DMEM	Dulbecco's Medified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EE	Encapsulation Efficiency
EMA	European Medicine Agency
EtOH	Etil Alkol
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Fourier Transform Infrared
HCl	Hidroklorik Asit
HMA	High Melting Agarose
IC50	Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon
LMA	Low Melting Agarose
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NP	Nanopartikül
OD	Optical Density

PBS	Fosfat Tamponu
PDI	Çoklu Dağılım İndeksi
PEST	Penisilin-Streptomisin
PGA	PoliglikolikAsit
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik Asit
PVA	Polivinil Alkol
RY	Reaksiyon Verimi
SA	Sinapik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
TI	Tail Intensity
TL	Tail Length
TM	Tail Moment
WHO	World Health Organization
UV	Ultra Violet

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 Sinapik asit molekülünün kimyasal yapısı [16].....	6
Şekil 2. 2 Nanoküre ve nanokapsül yapılarının şematik olarak gösterimi.....	18
Şekil 2. 3 Poli(Laktik asit) (PLA), Poli(Glikolik asit) (PGA) ve Poli(d,l-laktik-ko- glikolik asit) (PLGA) polimerlerinin kimyasal yapıları[75].....	22
Şekil 2. 4 PLGA polimerinin hidrolizi[75].	23
Şekil 2. 5 Yüzey ve yığın erezyonunun zamana bağlı şematik gösterimi [82].	24
Şekil 2. 6 PLGA nanopartiküllerinin bozunma aşamaları[75].....	24
Şekil 2. 7 Tekli emülsiyon solvent uçurma yöntemi ile nanopartikül hazırlanmasına ait şematik gösterim[85].	26
Şekil 2. 8 İkili emülsiyon solvent uçurma yöntemi ile nanopartikül hazırlanmasına ait şematik gösterim[89].....	27
Şekil 2. 9 Nanopartikül karakterizasyonunda kullanılan çift ışık yollu UV- spektrofotometrenin şematik gösterimi.....	29
Şekil 2.10 Zeta potansiyel şematik gösterimi	31
Şekil 2.11 FTIR şematik gösterimi	32
Şekil 2.12 Taramalı elektron mikroskopu şematik gösterimi[101].....	33
Şekil 2.13 Hücre hatlarının şematik gösterimi[103].	35
Şekil 2.14 DNA hasarının floresan mikroskop altındaki genel görüntüsü [121].....	39
Şekil 2.15 Elektroforez ortamında negatif kutuptan pozitif kutuba (soldan sağa) doğru göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA görüntüleri. 0- Hasarsız DNA; I-Çok az hasarlanmış DNA; II-Az hasarlanmış DNA; III- hasarlanmış DNA; IV- tümüyle hasarlanmış DNA [121].....	40
Şekil 4. 1 Sinapik asit molekülünün etanole karşı UV spektrumu	52
Şekil 4. 2 Sinapik asitin etil alkole karşı hazırlanmış kalibrasyon eğrisi	52
Şekil 4. 3 Sinapik asit molekülünün suya karşı UV spektrumu.....	53
Şekil 4. 4 Sinapik asitin suya karşı hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.....	53
Şekil 4. 5 Optimize nanopartiküllere ait 60.000X büyütme oranı ile çekilmiş SEM görüntüsü.....	66
Şekil 4. 6 Serbest sinapik asit, PLGA polimeri ve sinapik asit yüklü nanopartiküllere ait FT-IR spektrum grafiği	67
Şekil 4. 7 Saatlere göre In vitro salım değerlerine ait sonuçlar	68
Şekil 4. 8 Günlere göre In vitro salım değerlerine ait sonuçlar.....	68
Şekil 4. 9 C6 Glioma ve L929 Fibroblast hücrelerinin faz kontrast mikroskopunda 5X objektif altında morfolojik görüntüleri.....	69

Şekil 4. 10 L929 fibroblast hücrelerinde MTT sonucu oluşan formazan yapıları (24.saat-5000µg/ml). A: Serbest sinapik asit uygulanan hücre B: Serbest sinapik asit uygulanan hücrenin MTT görüntüsü C: Sinapik asit yüklü nanopartikül uygulanan hücre D: Sinapik asit yüklü nanopartikül uygulanan hücrenin MTT görüntüsü.....	70
Şekil 4. 11 L929 Fibroblast hücre hattına ait %canlılık (24 saat)	71
Şekil 4. 12 L929 Fibroblast hücre hattına ait %canlılık (48 saat)	72
Şekil 4. 13 C6 Glioma hücrelerinde MTT sonucu oluşan formazan yapıları (24. saat-3000 µg/ml). A: Serbest sinapik asit uygulanan hücre B: Serbest sinapik asit uygulanan hücrenin MTT görüntüsü C: Sinapik asit yüklü nanopartikül uygulanan hücre D: Sinapik asit yüklü nanopartikül uygulanan hücrenin MTT görüntüsü.....	73
Şekil 4. 14 C6 Glioma hücre hattına ait %canlılık (24 saat)	74
Şekil 4. 15 C6 Glioma hücre hattına ait %canlılık (48 saat)	74
Şekil 4. 16 Genotoksik ajana maruz bırakılmış hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü. A1-A2 : Pozitif kontrol grubu(24-48 saat), B1-B2 : Negatif kontrol grubu(24-48 saat), C1-C2 : Serbest sinapik asit molekülü verilen hücre grubu(24-48 saat), D1-D2 : Sinapik Asit Yüklü NP verilen hücre grubu(24-48 saat).....	76

TABLO LİSTESİ

Tablo 4. 1 Nanopartikül optimizasyonunda kullanılan parametreler	54
Tablo 4. 2 Nanopartikül optimizasyonunda kullanılan parametreler(devamı).....	55
Tablo 4. 3 Sentezlenen partiküllere ait sonuçlar	58
Tablo 4. 4 Sentezlenen partiküllere ait sonuçlar (devamı)	59
Tablo 4. 5 Hücre deneylerinde kullanılan optimize nanopartiküller	62
Tablo 4. 6 Optimize nanopartiküllere ait boyut dağılım analiz grafikleri	64
Tablo 4. 7 Optimize nanopartiküllere ait zeta potansiyel dağılım analiz grafikleri	65
Tablo 4. 8 Comet Assay analiz sonuçları.....	77

Sinapik Asit Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Fibroblast ve Glioma Hücre Soyları Üzerinde Sitotoksosite ve Genotoksitesinin İncelenmesi

Fatma Şayan POYRAZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Sunulan tez çalışmasında;farmakolojik özellikleri bilinen Sinapik Asit molekülünün ilaç etken maddesi olarak Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) içine enkapsüle edilmesi ile polimerik nanopartiküler sistemlerin oluşturulması ve karakterize edilmesi sonucu optimize edilen partiküler sistemin sitotoksik ve antijenotoksik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bir organ veya dokudaki hücrelerin kontrolsüzce bölünüp çoğalması durumunda oluşan kanser, bulunduğu dokuya veya organa göre oldukça farklı karakteristik özellikler göstermektedir. En sık görülen merkezi santral sinir sistemi tümörlerinden biri olan glioblastomalar agresif, invazif ve tedavisi zor kanser türleri olarak tanımlanmaktadır.

Yüksek toksisiteye sahip olmaları ve nonspesifik olarak hem normal hem kanserli hücrelerde birikmeleri, düşük çözünürlük ve sınırlandırılmış stabiliteden dolayı biyoyumluluk sağlayamamaları, kısa yarı ömürleri ile vücuttan hızla uzaklaştırılmaları gibi sınırlayıcı pek çok faktörden dolayı güncel antikanser

ajanlar kanser tedavisinde önemini yitirmektedir. Bu nedenle biyolojik uygulamalarda yaygın olarak ilaç taşıyıcı sistemler kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan literatür taramasında nanopartiküler sistemlerin aynı etken maddenin serbest formuna kıyasla daha etkili olduğu gözlenmiş ancak sinapik asit molekülünün partiküler sistemlere yüklendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu kapsamda sinapik asit molekülü PLGA polimeri içerisine enkapsüle edilerek karakterizasyonu ve optimizasyonu sağlanmıştır. Sentezlenen nanopartiküllerin karakteristik özellikleri UV görünür bölge spektroskopisi, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ve Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir.

Optimize partiküllere ait ortalama değerlere bakıldığında reaksiyon verimleri %52,61, enkapsülasyon etkinliği %54,58, ilaç yükleme kapasitesi %46,28, boyut 155,7 nm, çoklu dağılım indeksi 0,0080, zeta potansiyel değeri -22,5 mV olarak bulunmuştur.

Optimize edilen nanopartiküler sistemlerin sitotoksitesi serbest molekül ile karşılaştırmalı olarak *In vitro* koşullarda L929 Fibroblast ve C6 Glioma hücre soyu üzerinde 24. ve 48. saat muamelesi sonucu incelenmiş, fibroblast hücre hattında 24 saat deneyleri için IC50 değerleri sırasıyla ; 811,0 µg/ml serbest sinapik asit ve 960,0 µg/ml sinapik asit NP, 48. saat için 567,4 µg/ml serbest sinapik asit ve 815,7 µg/ml sinapik asit NP şeklinde belirlenmiştir. Glioma hücre hattında ise 24 ve 48 saat deneyleri için IC50 değerleri sırasıyla ; 348,2 µg/ml serbest sinapik asit ve 256,3 µg/ml sinapik asit NP, 48. saat için 314,7 µg/ml serbest sinapik asit ve 130,3 µg/ml sinapik asit NP olarak belirlenmiştir. Ayrıca C6 Glioma hücre soyunda serbest sinapik asit ve sinapik asit yüklü nanopartikülün antigenotoksik etkisine bakılmış; en uzun kuyruk yapısı H₂O₂ ile DNA hasarı oluşturulan pozitif kontrol grubunda görülürken, DNA hasar oranları; kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentine bakıldığında pozitif kontrol grubunu sırası ile negatif kontrol, serbest sinapik asit ve sinapik asit yüklü nanopartikül grubu takip etmiştir. Hücrelerin genel olarak 0. ve 1. Dereceden kuyruk yapısı oluşturduğu, nanopartiküler sistemin DNA hasarını azaltmada serbest sinapik aside kıyasla daha etken rol oynadığı belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda optimize formülasyonun doku veya hedef organı olumsuz etkileyen kemoterapotik ajanlara alternatif olarak beyin kanseri tedavisinde kullanılacak yeni nesil ilaç ve tedavi ajanlarının geliştirilmesine katkı sağlayacağı, meydana gelebilecek DNA hasarı sonucunda oluşacak çeşitli hastalıkları önleyebileceği düşünölmektedir. Ayrıca güçlü antikanser ve antigenotoksik etkisi olan hidrofobik moleküllerin ilaç sistemine dönüşmesinde faydalı bir model olabileceği düşünölmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sinapik asit, polimerik nanopartiköl, sitotoksisite, genotoksisite.



Investigation of Cytotoxicity and Genotoxicity of Sinapic Acid Loaded Polymeric Nanoparticles on Fibroblast and Glioma Cell Lines

Fatma Şayan POYRAZ

Department of Molecular Biology and Genetics

Postgraduated Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Banu MANSUROĞLU

The aim of this study was to investigate the anticancer and antigenotoxic properties of the particle system which is optimized by the formation and characterization of polymeric nanoparticulate systems by the encapsulation of the known pharmacological properties of Sinapic Acid molecule into the PLGA.

In the event of cells uncontrolled division and proliferation of cells in an organ or tissue, cancer occurs. It has a very different character according to the tissue or organ. Glioblastomas, one of the most common central nervous system tumors, are defined as aggressive, invasive and difficult to treat cancer types. Current anticancer agents lose their importance in cancer treatment because of their high toxicity and nonspecific accumulation in both normal and cancerous cells, low solubility and limited stability, their inability to provide biocompatibility, short half-lives and rapid removal from the body. Therefore, drug delivery systems have been widely used in biological applications. In the literature search, it was

observed that the nanoparticulate systems were more effective than the free form of the same active substance, but no study was found in which the sinapic acid molecule was charged to the particulate systems. In this context, sinapic acid was encapsulated into PLGA polymer and its characterization and optimization was provided. The characteristic features of synthesized nanoparticles were determined by UV visible spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and Scanning electron microscopy (SEM).

When the average values of the optimized particles were evaluated, the reaction yields 52.61%, the encapsulation efficiency 54.58%, the drug loading capacity 46.28%, the size 155.7 nm, the multiple distribution index 0.0080 and the zeta potential value -22.5 mV were found.

The cytotoxicity of the optimized nanoparticulate systems as compared to free molecules were investigated under in vitro conditions over the L929 Fibroblast and C6 Glioma cell lines within 24 hours and 48 hours timelines. On the fibroblast cell line, IC 50 values were respectively as following: Concentration of 811,0 µg / ml free sinapic acid and 960,0 µg / ml sinapic acid NP was determined for 24 hours experiments and 567,4 µg / ml free sinapic acid and 815,7 µg / ml sinapic acid NP for 48 hours experiments. On the glioma cell line, the IC 50 values for 24- 48 hours experiments were respectively 348,2 µg / ml free sinapic acid and 256,3 µg / ml sinapic acid NP, followed by 484,7 µg / ml free sinapic acid and 130,3 µg / ml sinapic acid NP level at 48 hours.

In addition, the antigenotoxic effect of free sinapic acid and the nanoparticle loaded with sinapic acid in the C6 Glioma cell line were investigated; the longest tail structure was observed on DNA damage caused by H₂O₂ in the positive control group and when the tail length, tail density and tail moment were examined, the positive control group was respectively followed by negative control, free sinapic acid and sinapic acid loaded nanoparticle group in DNA damage rates. It was determined that cells generally form 0th and 1st level tail structures and the nanoparticulate system plays a more active role in reducing DNA damage than free sinapic acid.

According to the findings, it is thought that the optimized formulation will contribute to the development of new generation drugs and treatment agents that

will be used in the treatment of brain cancer as an alternative to chemotherapeutic agents affecting the tissue or target organ negatively and may prevent various diseases resulting from DNA damage. In addition, it is thought that hydrophobic molecules with strong anticancer and antigenotoxic effect may be a useful model for transformation into the drug system.

Keywords: Sinapic acid, polymeric nanoparticles, cytotoxicity, genotoxicity.



1.1 Literatür Özeti

Bitkilerde oldukça fazla bulunan fenolik bileşikler bitkinin çevresel stres koşullarına karşı oluşturduğu savunma mekanizması sonucu ortaya çıkan sekonder metabolitler olup özellikle meyve ve sebzelerde bolca bulunurlar.

Küçük bir hidrokisinasamik asit türevi olan sinapik asit (3,5-dimetoksi-4-hidroksinasamik asit), bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bir bileşik olup fenilpropanoid ailesinin bir üyesidir ve organizmalarda serbest ya da ester formunda bulunabilir. İnsan diyetinde önemli bir yere sahip meyve, sebze, tahıl, bazı baharatlar ve şifalı otlarda bolca bulunan sinapik asitin organizmalar üzerindeki farmakolojik özelliklerini belirlemek ve bu maddenin etki mekanizmalarını aydınlatılabilmek için çeşitli *In vivo* / *In vitro* çalışmalar yürütülmüş ve bu çalışmalar sonucunda geniş spektrumlu farmakolojik özellikler gösterdiği kanıtlanmıştır. Bu özellikler başlıca; antiinflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal, ankisiyolitik, nöroprotektif, kardiyoprotektif, hepatoprotektif, antihiperlipidemik ve antikanser özelliklerdir[1-3].

Nanopartiküller, mikron altı boyutlarda, çeşitli fizikokimyasal özelliklere sahip polimerler kullanılarak hazırlanan katı, kolloidal partiküllerdir. Nanopartiküler yapılara çeşitli ilaç etken maddeleri yüklenerek taşıyıcı sistemler oluşturulabilir[4].

Polimerik nanopartiküller diğer kolloidal taşıyıcı sistemlerle kıyaslandıklarında biyolojik sıvılarda yüksek stabiliteye sahip yapılardır. Çeşitli moleküllerin partikül içerisine yüklendiği sistemler ile ilaç etken maddeler lokalize veya sistemik olarak taşınabilir[5].

Geleneksel dozaj formlarına kıyasla oldukça fazla avantajı olan kontrollü ilaç salım sistemlerinde nanopartiküller, etken maddenin polimerik yapı içerisinden difüze

bir şekilde salımını sağlar. Polimerik membran içerisinde bulunan etken maddenin polimerdeki çözünürlüğü ve difüzyon hızı salım profilinde önemli bir etkiye sahiptir. Partiküler sistem oluşturulurken yapıya eklenen yardımcı kimyasallar ve yüzeye adsorbe olabilen etken madde miktarı da salımı etkileyen faktörlerdendir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), beyin kanser çeşitlerini kanserli hücrelerin moleküler ve histolojik özelliklerini baz alarak dört prognostik dereceye ayırmış, III. ve IV. dereceden tümörleri malign gliomalar olarak belirtmiştir. Malign gliomalar histolojik olarak heterojen ve glialardan türeyen invaziv tümörler olup glioblastoma olarak da adlandırılırlar.

Glioblastomalar en sık görülen merkezi santral sinir sistemi tümörleridir ve bu hücreler agresif, invazif ve tedavisi zor hücreler olarak tanımlanmaktadır. Glioblastomalar ayrıca mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroza sebep olabilmektedir[6].

Yüksek toksisiteye sahip olmaları ve nonspesifik olarak hem normal hem kanserli hücrelerde birikmeleri, düşük çözünürlük ve sınırlandırılmış stabiliteden dolayı biyouyumluluk sağlayamamaları, kısa yarı ömürleri ile vücuttan hızla uzaklaştırılmaları gibi sınırlayıcı pek çok faktörden dolayı güncel antikanser ajanlar kanser tedavisinde önemini yitirmektedir. Nanopartiküller fonksiyonel özellikleri sebebiyle biyolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerdir[7].

Biyobozunur bir polimer olan PLGA özellikle doku mühendisliğinde ve ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında önemli bir potansiyele sahip olup Avrupa İlaç Ajansı (European Medicine Agency (EMA)) ve Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration; FDA) tarafından onaylı bir üründür[8].

Yapılan literatür taramasında polimerik nanopartiküllerin antikanser ve antigenotoksik özellikleri ile ilgili çok sayıda çalışmaya rastlanmasına rağmen Sinapik Asit molekülünün etken madde olarak kullanıldığı nanopartiküler sistemlere rastlanmamıştır. Bu nedenle; sunulan bu tezde bir çeşit fenolik bileşik olan Sinapik Asit molekülü PLGA kopolimeri kullanılarak tekli emülsiyon yöntemi ile nanopartiküler sisteme yüklenmiş, çeşitli ölçüm yöntemleri ile oluşturulan

nanopartikül formülasyonunun karakterizasyonu sonucu optimize edilen nanopartiküllerin ve in vitro salımı incelenerek sitotoksik ve genotoksik etkilerine bakılmıştır.

1.2 Tezin Amacı

Geniş spektrumlu farmakolojik özelliklere sahip Sinapik Asit molekülü yapılan çalışmalarla etkisi kanıtlanmış, suda çözünürlüğü düşük bir moleküldür. Bu nedenle suda çözünürlüğü az olan Sinapik Asit molekülünün nanopartiküler sistemlere yüklenmesi ile çözünürlüğünün ve biyoyumluluğunun artırılması ve daha düşük dozlarda daha etkili nanopartiküler formülasyonların geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Tez kapsamında hazırlanan Sinapik Asit yüklü nanopartiküllerin serbest Sinapik Asit molekülü ile karşılaştırmalı olarak C6 Glioma hücre soyu üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkisi incelenmiştir.

MTT analizi ile nanopartiküler sistem ile serbest molekülün toksik etkisi karşılaştırılmış, comet assay yöntemi ile yapılan genotoksisite testinde ise nanopartiküler sistem ile serbest molekülün DNA hasar büyüklüğü üzerine etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada; Sinapik Asit molekülünün nanopartiküler sistemlere yüklenmesi ile biyoyumluluğunun artırılması ve maddenin kontrollü salım sistemi mekanizması sayesinde dolaşım sistemi içerisinde daha uzun süre bozunmadan kalarak etkinliğini sürdürebilmesi amaçlanmaktadır. Sinapik asit yüklü nanopartiküler sistemin farklı parametrelerde sentezlenerek optimize formülasyonuna ulaşılması ve optimize edilen biyoyumluluğu yüksek partiküllerin sitotoksik ve antigenotoksik etkinliğinin artırılmasının hedeflendiği çalışmanın ilaç taşıyıcı sistemler için referans olabileceği düşünülmektedir.

2.1 Kanser

Kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin kontrolsüzce bölünüp çoğalmasına verilen addır. Kanseri tipleri oldukça çeşitli olmakla beraber temelde tamamı anormal hücrelerin kontrol dışı çoğalması ile başlamaktadır. Kanseri (cancer) terimi, Yunan fizikçi Hippocrates'in carcinos ve carcinoma terimlerini ülser oluşturan ve ülser oluşturmayan tümörler şeklinde kullanması ile ortaya çıkmıştır.

Kas ve sinir hücreleri gibi istisnalar dışında canlı vücudunda bulunan tüm sağlıklı hücreler sürekli olarak bölünebilme yeteneğine sahiptir. Erken dönemlerde hücreler daha hızlı bölünürken, erişkinlik ile beraber bu hız yavaşlamakta ve hücreler bölünme yeteneklerini zamanla kaybetmektedir. Her hücrenin sahip olduğu belli bir bölünebilme sayısı vardır ve hücreler bölünme yeteneğini kaybettiği zaman apoptoz denilen kontrollü hücre ölümü ile yok edilirler.

Normal hücrelerin maligniteye dönüştüğü süreç genom hasarının bir sonucu olarak peşpeşe mutasyonların biriktirilmesi ile ortaya çıkmaktadır. Çeşitli kimyasallar, virüsler, beslenme faktörleri, genetik faktörler, ultraviyole ışınlar veya radyasyon gibi nedenlerden dolayı DNA hasar görebilir ve bulunduğu hücrelerde anomaliye sebep olabilir [9]. Kansere sebep olan hücrelerin normal, sağlıklı hücreler ile farkına bakıldığında canlı vücudunda bulunan trilyonlarca hücreden hemen hemen herhangi birinde başlayabilen kanser, hücrelerin düzenli bölünme süreçlerini bozmakta ve hücreler gittikçe daha fazla anormal hale gelmektedir. Kanseri oluşumunda, apoptoza uğraması gereken eski veya hasarlı hücreler ölmesi gereken yerde hayatta kalarak yeni hücreleri oluşturur ve oluşan yeni hasarlı hücreler sürekli olarak bölünerek genellikle tümör adı verilen anormal, katı formda dokuları oluştururlar.

Kanseri temel olarak altı biyolojik özellik ile karakterize edilmektedir. Bunlar; çoğalma sinyalinin sürdürülmesi, büyüme baskılayıcılarından kaçınma, hücre

ölümüne direnme, replikatif ölümsüzlüğü sağlama, anjiyogenez ve istila/metastaz şeklinde sıralanabilir[10].

Kanser, sebebi tam olarak bilinmeyen bir hastalık olmakla beraber temelde değiştirilebilir ve değiştirilemeyen iki grup risk faktöründen meydana gelmektedir. Değiştirilemeyen faktörler yaş, cinsiyet ve aile öyküsüdür. Değiştirilebilir faktörler ise çevresel kaynaklı etkenler olup bunlar ; sigara ve alkol kullanımı, radyasyona maruz kalma, virüsler, beslenme alışkanlıkları, ultraviyole ışınlarla uzun süre maruz kalma, çeşitli kimyasallar ve hava kirliliği gibi sıralanabilir[11].

Kanser çeşitleri oluştukları doku veya organa göre kolorektal, lenfoma, sarkom, serviks, melanom gibi özel isimlerle adlandırılmaktadır. Görülme sıklığı açısından cinsiyet, coğrafi bölge, ırk vb. özellikler kanser türlerinde değişkenlik göstermektedir[9].

2.1.1 Kanser Türleri ve Beyin Kanseri

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), beyin kanser çeşitlerini kanserli hücrelerin moleküler ve histolojik özelliklerini baz alarak dört prognostik dereceye ayırmış, III. ve IV. dereceden tümörleri malign gliomalar olarak belirtmiştir. Malign gliomalar histolojik olarak heterojen ve glialardan türeyen invaziv tümörler olup glioblastoma olarak da adlandırılırlar.

Glioblastomalar en sık görülen merkezi santral sinir sistemi tümörleridir ve bu hücreler agresif, invazif ve tedavisi zor hücreler olarak tanımlanmaktadır. Glioblastomalar ayrıca mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroza sebep olabilmektedir[6].

Biyolojik ve genetik farklılıklarına göre glioblastomalar iki alt gruba ayrılmaktadır. Birincil glioblastomalar tipik olarak epidermal büyüme faktör reseptörlerinin (EGFR) amplifikasyonu ve mutasyonları sonucunda, 10. Kromozomun uzun kolunda meydana gelen heterozigotluk kaybından dolayı, proliferasyon ve migrasyon gibi birçok hücre fonksiyonu düzenleyen kromozomun 10q23 bölgesinde bulunan protein tirozin fosfotaz ve tensin homoloğu (PTEN) geninin silinmesi gibi özelliklerle karakterize edilmektedirler ve genellikle 50 yaşından büyük hastalarda görülürler [12].

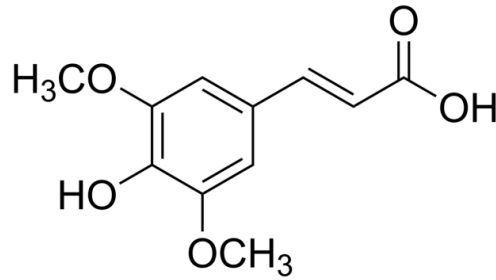
İkincil glioblastomlar ise, düşük dereceli veya anaplastik astrositomalar olarak daha genç hastalarda ortaya çıkan ve birkaç yıl içinde glioblastomlara dönüşen kanser türleridir. Birincil glioblastomlardan çok daha az yaygın olan bu tümörler genellikle p53 tümör baskılayıcı geninde meydana gelen mutasyonlarla karakterizedir [12].

Sekonder glioblastomlar, DNA kopya sayısında birincil glioblastomlardan belirgin bir şekilde farklı olan transkripsiyonel paternlere ve sapmalara sahiptir [13].

Tüm bu genetik farklılıklarına rağmen, birincil ve ikincil glioblastomlar morfolojik olarak ayırt edilememekte ve standart tedavilere verdikleri yanıtlar benzer özellikler göstermektedir. Bu nedenle bu kanser türleri için hedeflendirilmiş moleküler tedaviler önerilmektedir[12-15].

2.2 Sinapik Asit

Küçük bir hidroksisünamik asit türevidir olan sinapik asit (Şekil 2.1) (3,5-dimetoksi-4-hidroksisünamik asit), bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bir bileşik olup fenilpropanoik ailesinin bir üyesidir ve organizmalarda serbest ya da ester formunda bulunabilir[1, 2]. Molekül formülü $C_{11}H_{12}O_5$ ve moleküler ağırlığı 224,21 g/mol olan sinapik asit insan diyetinde önemli bir yere sahip olan meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda, bazı baharatlarda ve şifalı otlarda bolca bulunmaktadır [1, 3].



Şekil 2. 1 Sinapik asit molekülünün kimyasal yapısı [16].

Sinapik asitin organizmalar üzerindeki farmakolojik özelliklerini belirlemek ve bu maddenin etki mekanizmalarını aydınlatmak için çeşitli *In vivo* / *In vitro* çalışmalar yürütülmüş ve bu çalışmalar sonucunda geniş spektrumlu farmakolojik özellikler gösterdiği kanıtlanmıştır. Bu özellikler başlıca; antiinflamatuar,

antioksidan, antimikrobiyal, ankisiyolitik, nöroprotektif, kardiyoprotektif, hepatoprotektif, antihiperlisemik ve antikanser özelliklerdir.

2.1.1 Sinapik asitin Farmakolojik Özellikleri

2.1.1.1 Antiinflamatuvar Etki

Sinapik asitin, kolit fare modelinde enflamatuvar değişiklikler üzerindeki etkisini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada sinapik asit ve deksametazon Balb/c dişi farelere oral yoldan uygulanmış, sinapik asitin kolon yaralanması veya hasarı üzerindeki anti-enflamatuvar etkisinin oldukça etkili olduğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada myeloperoksidaz aktivitesi, malondialdehit ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) kolonik doku seviyeleri de sinapik asitin uygulanması sonucu azalmıştır. Bu çalışmanın bulguları sinapik asitin bağırsak iltihabı üzerinde anti-enflamatuvar etkiler uyguladığını ve enflamatuvar barsak hastalığının tedavisinde yeni bir terapötik aday olarak seçilebileceğini göstermektedir[17].

Sinapik asit ve türevleri ile yapılan bir çalışmada inflamasyonun patogenezinde önemli bir rol oynayan transkripsiyon faktörü NF-kB ve ilgili sitokinleri IL-6 ve IL-8'in ekspresyonunu azaltmak için bir dizi sinapik asit türevi sentezlenmiş ve anti-enflamatuvar etkileri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak hazırlanan tüm bileşiklerin güçlü antiinflamatuvar aktiviteler gösterdiği belirlenmiştir[18].

Sinapik asitin anti-enflamatuvar potansiyelini ve bunun altında yatan mekanizmayı araştırmak için sinapik asitin pro-inflamatuvar mediatörlerin üretimi üzerindeki inhibitör etkisinin incelendiği bir *In vivo* çalışmada sinapik asitin lipopolisakarit (LPS) kaynaklı nitrik oksidi (NO), prostaglandin E2'yi (PGE2), tümör nekroz faktörü olan TNF- α 'yı ve interlökin (IL) -1 β üretimini doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği kanıtlanmıştır. Bu bulgular ile uyumlu olarak, sinapik asit protein seviyelerinde LPS kaynaklı uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz (COX) -2 ekspresyonlarını inhibe ettiği gözlenmiş, sonuç olarak iNOS ve COX-2 indüksiyonunun ve pro-enflamatuvar sitokinlerin sinapik asit tarafından üretilmesinin baskılanmasının, serotonin veya karragenan tarafından sıçanlarda ve farelerde pençe ödem oluşumunun inhibe edilmesinde rol oynayan önemli mekanizmaları temsil edebileceği ortaya koyulmuştur[19].

2.1.1.2 Antioksidan Etki

Oksidatif stres yaşlanma, kanser, ateroskleroz, diyabet, nörodejeneratif, karaciğer ve böbrek hastalıkları gibi birçok hastalığın patolojisinde rol oynamaktadır. Oksidatif strese bağlı hastalıklara karşı koruma sağlayabilen diyet antioksidanları vücut hücrelerini serbest radikallerden ve reaktif oksijen türlerinden (ROS) kaynaklanan hasarlardan koruyabilen organik moleküller olarak tanımlanmaktadır[1]. Monofenolik bir yapıya sahip olan sinapik asit molekülü yapısında bulunan hidroksil grubu sayesinde elektron alıp verebilir ve oksitleyici/redükleyici etki gösterebilir. Bu özelliği dolayısıyla molekül antioksidan etki göstermektedir[20].

Sinapik asit, antioksidan özelliklerinden dolayı, çeşitli dejeneratif bozuklukları veya oksidatif hasara bağlı hastalıkları önlemede önemli bir rol oynamaktadır Temel antioksidan aktivitelerine bağlı olarak; gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisinde potansiyel kullanımı önerilmektedir[1].

Sinapik asit ve resveratrol tedavisinin antioksidan etkisi ve bağırsak mikrobiyaya dengesizliğinde potansiyel iyileştirici olabileceği varsayılan bir çalışmada beş gruba ayrılan sıçanlara resveratrol, sinapik asit ve her iki polifenolün kombinasyonu birlikte verilmiş, sıçanlarda açlık kan glikoz seviyeleri etkili bir şekilde düşerken, reaktif oksijen türleri ve malondialdehit düzeyleri azalmış, sinapik asit tüketimi ile karaciğerde toplam antioksidan kapasitesinin arttığı gözlenmiştir[21].

Hidroksisinamik asitlerin ONOO⁻ süpürme kabiliyetlerinin araştırıldığı başka bir çalışmada sinapik asit, askorbik asit ve alfa-tokoferol ile karşılaştırıldığında oldukça güçlü bir antioksidan olarak gözlemlenmiştir[22].

Pekkarinen ve ark. yaptığı çalışmada farklı konsantrasyonlarda sinapik asit içeren fenolik asitlerin homojen ve heterojen lipid sistemlerinde lipid oksidasyonunu inhibe etme özelliği değerlendirilmiş ve sinapik asit her iki sistemde de hidroperoksit oluşumunda ferulik asit ve alfa tokoferolden daha etkili çıkmıştır[23].

Sinapik asitin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilin (DPPH) paramanyetik stabil radikaline karşı serbest radikal temizleme kabiliyeti gösterdiği yapılan çeşitli çalışmalar sayesinde bilinmektedir[24]

Yüksek oranda reaktif olan hidroksil radikalleri ($\cdot\text{OH}$), yaşam sistemlerinde çevrelerine zarar verme potansiyeline sahiptir[24]. Askorbik asit ile kıyaslandığında sinapik asit, $\cdot\text{OH}$ radikali için daha düşük dozlarda daha güçlü bir antioksidan olarak etki göstermiştir[25].

Ferulik asit, klorojenik asit ve p-kumarik asit gibi hidroksisinamik asitler ile kıyaslandığında sinapik asitin $\text{ClO}\cdot$ ve ($\cdot\text{NO}$) radikallerinde daha güçlü temizleme potansiyeli olduğu belirlenmiştir[24].

Peroksinitrit (ONOO^-) potansiyel olarak apoptozu başlatabilen bir radikaldir. Sinapik asitin, askorbik asit, penisilamin ve tokoferol gibi standart antioksidanlarla karşılaştırıldığı bir çalışmada sığır serum albümini içindeki 3-nitrotirosin oluşumunu inhibe ederek daha iyi ONOO^- temizleme aktivitesi gerçekleştirdiği ve bu aktivitenin besiyerindeki Na_2CO_3 varlığında daha da arttığı belirlenmiştir[26, 27].

Hidroperoksitlerin oluşumunda α -tokoferol ve ferulik asit ile sinapik asitin karşılaştırıldığı bir çalışmada, sinapik asit metil linoleat içindeki lipit oksidasyonunu önleyerek hidroperoksit oluşumunu baskılamada daha etkili olmuştur[23, 28].

Sinapik asitin antioksidan etkinliğinin esterifikasyona etkisini belirlemek için Gaspar ve ark. metil, etil, propil ve butil sinapatların antioksidan aktivitelerini incelemiştir; sinapik asit ve alkil esterlerinin antioksidan aktivitesi, lipit model sistemi olarak saf linoleik asitin diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizi ile değerlendirilmiştir. DSC verilerine göre sinapik asit alkil ester türevleri, oksidasyon indüksiyon sıcaklığını arttırdıkları için lipit oksidasyonunun inhibisyonunda güçlü antioksidanlar olarak görev almıştır[29].

Düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonu insan vücudunda ateroskleroz ve diğer hastalıkların gelişiminde kritik rol oynamaktadır. Sinapik asitin, $10\ \mu\text{M}$ gibi düşük seviyelerde dahi LDL oksidasyon hızını önemli ölçüde

azalttığı, 20-40 μ M seviyelerinde ise oksidasyonu tamamen engellediği Andreasen ve ark. tarafından belirlenmiştir[30].

Antioksidan özellikleri bilinen kafeik asit ve ferulik asit ile kıyaslandığında sinapik asitin etkinliği ferulik asitten oldukça yüksek, kafeik aside göre ise güçlü bir antioksidan olarak önerilmiştir[20, 31].

2.1.1.3 Nöroprotektif Etki

Sinapik asitin nöroprotektif etkisine ait çalışmalar son yıllarda oldukça artmıştır. Karakida ve ark. yaptığı çalışmada sinapik asit, potasyum siyanid (KCN) kaynaklı hipoksi ve skopolamin kaynaklı hafıza bozukluğunu inhibe etmiş; ek olarak, farelerde dekompresyon (veya bilateral karotid arter ligasyonu) ile indüklenen hipoksi (veya mortalite) ve bazal ön beyin lezyonu ile indüklenen serebral kolinerjik disfonksiyonunu inhibe etmiştir[32].

Sinapik asitin farelerde kainik asit kaynaklı hipokampal beyin hasarı üzerindeki nöroprotektif etkilerini araştırmak için oral uygulama yoluyla 10 mg/kg doz verilmiş ve sinapik asit kainik asit kaynaklı nöbet benzeri davranış üzerinde antikonvülzan etki göstermiştir. Ayrıca aynı dozda sinapik asit, kainik asitten 6 saat sonra geç uygulandığında CA1 ve CA3 hipokampal bölgelerinde kainik asit kaynaklı nöronal hücre ölümünü önemli ölçüde hafifletmiştir[33].

Bir GABA (A) reseptörü agonistik özelliğine ve serbest radikal temizleme aktivitesine sahip olan sinapik asit kullanılarak global serebral iskemi hayvan modelinde potansiyel nöroprotektif etkisine ve bilişsel bozukluk üzerine etkilerine bakılmıştır. Serebral iskemi hastalarında damar tıkanıklığından önce 14 gün boyunca sinapik asit uygulanmış, bilişsel bozulmayı önleyip önlemediğini belirlemek için ise Morris su labirenti kullanılmıştır. Sonuç olarak sinapik asitin özellikle iskemik hipokampal nöronlar için önemli ölçüde nöroprotektif etki gösterdiği belirlenmiştir[34].

Sinapik asitin amiloid β (A β) (1-42) proteini kaynaklı Alzheimer hastalığı üzerine etkilerini incelemek amacıyla hipokampusa iki taraflı A β (1-42) proteini enjekte edilerek Alzheimer hastası yapılan fareler ile çalışmalar yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda sinapik asit, hipokampal CA1 bölgesinde nöronal hücre ölümünü

kurtarmış, A β (1-42) proteini tarafından indüklenen iNOS ekspresyonu, glial hücre aktivasyonları ve nitrotirozin ekspresyonlarının artışı hafifletmiştir. Böylece sinapik asitin A β (1-42) protein ilişkili Alzheimer patolojisi için etkili bir tedavi olabileceği kanıtlanmıştır[35].

Sinapik asitin antioksidan ve nöroprotektif özellikleri baz alınarak sıçanda erken model Parkinson hastalığı üzerine yapılan çalışmada molekül, dopaminerjik nöronların kaybını önlerken demir reaktivitesini, SOD, MDA ve nitrit seviyesini düşürmüştür. Bu sonuçlar, sinapik asitin, kısmen oksidatif stresin zayıflamasından ve muhtemel nigral demir seviyesinin düşmesinden kaynaklanan nörotoksositeye karşı nöroprotektif potansiyelini göstermektedir[36].

Sinapik asitin intraserebroventriküler streptozotosin (ICV-STZ) kaynaklı nöronal kayıp ve hafıza bozukluğu üzerindeki nöroprotektif etkisini açıklayabilmek için sıçanlar ile çalışma yapılmış ve sinapik asitin Alzheimer hastası sıçanlarda hafıza kaybını önlemede etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, hipokampustaki TNF- α seviyesi sinapik asit ile belirgin şekilde azalmış, antioksidan enzimlerin seviyeleri ve malondialdehit seviyesi düşmüştür. Histopatolojik inceleme sinapik asitin, Alzheimer sıçanlarında serebral korteks ve hipokampusta hücre kaybını azalttığını gözlenmiştir. Bu çalışma sinapik asitin hafıza kaybının önlenmesinde ve oksidatif stresin gelişmesinde etkili olduğunu ve Alzheimer hastalığının tedavisinde faydalı olabileceğini göstermektedir[37].

2.1.1.4 Anksiyolitik Etki

Hidroksisinamik asitlerin anksiyolitik etkisi ile ilgili çalışmalar çok olmamakla birlikte en önemli çalışmalardan biri Yoon ve ark. tarafından yükseltmiş bir artılabirent (EPM) ve delik-tahta testi kullanılarak sinapik asitin varsayılan anksiyolitik benzeri özelliklerinin karakterize edildiği çalışmadır. Bu çalışmanın sonucunda sinapik asit belirgin bir şekilde spesifik bir gama-aminobütirik asit (GABA) reseptörünün (ligand kapılı iyon kanalı: GABA(A) agonisti gibi davranarak tek kortikal nöronlardaki GABA akımını doza bağlı bir şekilde kuvvetlendirmiştir. Bu sonuçlar, sinapik asitin belirgin bir anksiyolitik ajan olduğunu ve anksiyolitik benzeri etkilerinin, GABA (A) reseptörleri ve kuvvetlendirici Cl⁻ akımları yoluyla aracılık ettiğini göstermiştir[38].

2.1.1.5 Kardiyoprotektif Etki

Sinapik asitin kardiyoprotektif etkilerine bakıldığında Roy ve ark. izoproterenol ile indüklenen miyokard enfarktüsülü sıçanlarda sinapik asitin lizozomal disfonksiyon üzerindeki koruyucu etkilerini incelemiştir. Sinapik asit ile tedavi, tüm biyokimyasal parametreleri normalleştirmesinin yanı sıra hasta sıçanlarda miyokard infarktüsünün boyutunu da düşürmüştür[39].

Yine Roy ve ark. yapmış olduğu başka bir çalışmada izoproterenol ile indüklenen miyokardiyal enfarktüsülü sıçanlarda sinapik asitin, kardiyak hipertrofi, dislipidaemi ve lipoproteinlerdeki ve elektrokardiyogramdaki değişiklikler üzerindeki koruyucu etkilerine bakılmış ve sinapik asitin antilipidaemik etkisinden dolayı lipit ve lipoprotein seviyelerindeki değişiklikleri önlediği gözlenmiştir[40].

Sinapik asitin yüksek tansiyon ve kardiyovasküler yeniden şekillenme üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada hipertansiyonu olan sıçanlarda dikkate değer bir şekilde yüksek tansiyon, miyokard, vasküler fonksiyon bozukluğu, kardiyak fibroz, oksidatif stres ve ACE aktivitesi hafiflemiştir. Çalışma, sinapik asitin antioksidan potansiyeli ile fibrozis ve oksidatif stresi hafifleterek, hipertansif kalp hastalığının tedavisinde yararlı bir rolü olabileceğini göstermektedir[41].

Sinapik asitin iskemi /reperfüzyon (I / R) yaralanmasına karşı antioksidan ve kardiyoprotektif potansiyelini değerlendirmek için tasarlanan bir çalışmada I/R'nin neden olduğu kardiyak fonksiyon bozukluğunun, yaralanmanın ve oksidatif stresin sinapik asit tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, *In vitro* sonuçlar sinapik asitin H9c2 hücrelerini oksidatif strese karşı koruduğunu ve mitokondriyal membran geçirgenliği geçişini (MPT) modüle ettiğini de göstermiştir. Sonuç olarak, *In vivo* ve *In vitro* deneylerden elde edilen sonuçlara göre antioksidan rolü olan sinapik asitin kardiyak hücreleri ve fonksiyonlarını I/R kaynaklı oksidatif strese karşı koruduğu doğrulanmıştır[42].

Sinapik asitin osteoartrit üzerindeki etkisine bakıldığında sinapik asit uygulanmış insan kondrositleri, *In vitro* olarak düşük seviyelerde interlökin (IL) -1 β ile indüklenmiş IL-6, prostaglandin E2 (PGE2), nitrik oksit (NO) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) göstermiş, *In vivo* çalışmalarda ise farelerde osteoartritin ilerlemesini geciktirmiştir[43].

2.1.1.6 Antimikrobiyal Etki

Antimikrobiyal etkilerine bakıldığında sinapik asitin çeşitli patojenlere karşı etkili olduğu farklı çalışmalarla gösterilmiştir.

Sarı hardal tohum ekstraktından izole edilen bileşiklerin analizi yapıldığında bu bileşikler 4-hidroksi-3-nitrofenilasetik ve sinapik asit olarak tanımlanmış ve sinapik asitin hidroksil grubunun *Escherichia coli*'ye karşı ; benzen halkası sübstitüentlerinin ise *Salmonella enteritidis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir[44].

Xylella fastidiosa, birçok mahsul türünde hastalıklara neden olan ve önemli ekonomik kayıplara neden olan patojenik bir bakteridir. Sinapik asit dahil olmak üzere birçok fenolik bileşiğin anti-*Xylella* aktivitesi değerlendirildiğinde genel olarak düşük minimum inhibe edici konsantrasyonlarla *X. fastidiosa* büyümesini inhibe etmede etkili oldukları gözlenmiştir[45].

Farklı oranlarda kitosan-kafeik asit, kitosan-ferulik asit ve kitosan-sinapik asit konjugatlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri incelendiğinde konjugat yapıların antioksidan aktiviteleri modifiye edilmemiş kitosana kıyasla daha etkin özellik göstermiş, çeşitli patojenlere karşı güçlü antimikrobiyal aktivite sergilemiştir[46].

Çörek otu tohumlarının fitokimyasal bileşimini daha iyi anlamak için fenolik asit ve flavonoid içeriği açısından analiz edildiği bir çalışmada ana bileşenler sinapik asit ve kaempferol olarak belirlenmiş, ekstraksiyon ürünleri agar difüzyon yöntemi kullanılarak *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* ve *Escherichia coli*'ye karşı test edilmiştir. Sonuç olarak test edilen mikrobiyal suşlara karşı ekstrakt yapısı önemli ölçüde inhibitör aktivite sergilemiştir[47].

2.1.1.7 Hepatoprotektif Etki

Sinapik asitin sıçanlarda arsenik kaynaklı toksisiteye karşı koruyucu rolünü karakterize etmek için yapılan çalışmada Pari ve ark. sıçanlara oral olarak arsenik ve sinapik asidi 30 gün boyunca farklı dozlarda (10 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg) uygulamış, sinapik asit uygulamasının hepatik dokuda arsenik kaynaklı toksisiteyi tersine çevirdiği gözlenmiştir. 40 mg/kg gün dozundaki etki diğer iki dozdan daha

belirgin etki gösterirken tüm bu değişiklikler, arsenik konsantrasyonunun azalması ve karaciğerin histopatolojik gözlemleri ile desteklenmiştir[25].

Sinapik asitin wistar sıçanlarda normal ve streptozotosin (STZ) kaynaklı diyabette bazı biyokimyasal belirteçler, karaciğer ve böbrek histolojisi üzerindeki etkisi araştırıldığında 35 gün boyunca oral olarak verilen sinapik asitin tüm biyokimyasal parametreleri, karaciğer ve böbrekte meydana gelen histopatolojik değişiklikleri normale döndürdüğü gözlenmiştir [48].

Shin ve ark. sıçanlarda karbon tetraklorür (CCl₄) kaynaklı akut hepatik hasara sinapik asitin etkisini araştırmış, oral yol ile sinapik asit tedavisi karaciğer histolojisinde, serum alanin transaminaz, aspartat transaminaz aktivitelerinde ve karaciğer malondialdehit seviyelerinde CCl₄ kaynaklı anormallikleri azaltmıştır. Ek olarak, sinapik asit tedavisi TNF- α ve IL-1 mRNA seviyeleri de dahil olmak üzere CCl₄ kaynaklı enflamatuar araçların üretimini önemli ölçüde hafifletmiş ve NF- κ B p65 ifadesini arttırmıştır. Sinapik asitin sıçan karaciğerini CCl₄ kaynaklı iltihaptan koruması hepatik enflamasyonu baskılamak için terapötik bir madde olarak kullanılabileceğini göstermektedir [49].

Sinapik asitin dimetilnitrozamin (DMN) kaynaklı kronik karaciğer hasarlı sıçanlarda hepatoprotektif ve antifibrotik etkileri araştırıldığında DMN'nin neden olduğu vücut ağırlığı kaybını önemli ölçüde önlediği, karaciğer hasarına karşı hepatoprotektif ve antifibrotik etkiler gösterdiği, siroza karşı korunmada potansiyel olarak faydalı bir ajan olabileceği belirtilmiştir [50].

2.1.1.8 Antihiperglisemik Etki

Streptozotocin kaynaklı diyabetik sıçanlarda sinapik asitin fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisini değerlendirmek için tasarlanan çalışmada Kanchana ve ark. normal, diyabetik ve sinapik asitle tedavi edilen diyabetik sıçanlar arasında karşılaştırma yapmış ve sinapik asit verilen sıçanlarda biyokimyasal parametrelerin normal seyrettiği gözlenmiştir. Böylece sinapik asitin streptozotosin kaynaklı diyabetik sıçanlarda potansiyel bir antihiperglisemik etkiye sahip olduğu ortaya koyulmuştur [51].

STZ uygulanarak oluşturulan Tip-1 diyabetik sıçanlar ile fruktoz bakımından zengin beslenerek oluşturulan Tip-2 diyabetik sıçanların kullanıldığı çalışmada sinapik asit doza bağlı olarak STZ-diyabetik sıçanların hiperglisemisini azaltmıştır. Ayrıca sinapik asit, sıçanlarda plazma insülin değerini değiştirmeden postprandiyal plazma glukozunu hafifletmiş, tekrarlanan sinapik asit tedavisi STZ-diyabetik sıçanların soleus kasındaki GLUT4'ün gen ekspresyonunu arttırmıştır. Fruktoz bakımından zengin sıçanlarda indirgenmiş glikoz infüzyon hızı sinapik asit tarafından yükseltilmiştir [52].

Piroptoz, diyabetik ateroskleroz dahil olmak üzere birçok enflamatuar hastalıkla ilişkilendirilen bir programlanmış hücre ölümü türüdür. Diyabetik aterosklerozda makrofajların piroptosisinde sinapik asitin etkisi incelenmiş ve düşük dozda (≤ 50 mg / kg) kronik sinapik asit uygulamasının kemik iliği kaynaklı makrofajların pirototik ölümünü baskıladığını görülmüştür[53].

2.1.1.9 Antikanser Etki

Sinapik asitin dahil olduğu fenolik bileşikler grubu, hücrenin sinyal yollarını modüle ederek, hücre ölüm sinyallerini etkinleştirir ve preneoplastik veya neoplastik hücrelerde apoptosisi başlatır, böylece kanser gelişimini ve ilerlemesini inhibe ederler [54].

İçeriğinde sinapik asit dahil olmak üzere sekiz farklı fenolik bileşik içeren üç farklı pirincin potansiyel kolon ve meme tümör baskılayıcı özellikleri araştırıldığında meme kanser hücre hatları olan MDA-MB-468 ve HBL-100 hücrelerini ve SW-480 kolon kanseri hücrelerini azalttığı görülmüştür [55].

MCF-7 insan meme kanseri hücrelerindeki DNA metiltransferazların aktivitesi ve gen ekspresyonunun incelendiği bir çalışmada farklı fenolik bileşiklerin MCF-7 hücrelerine etkileri incelenmiş ve sinapik asitin toksisitesinin diğer fenolik bileşiklere kıyasla çok az olduğu gözlemlenmiştir [56].

HeLa ve HT29 kanser hücreleri ile yapılan araştırmalarda sinapik asitin önemli ölçüde bu hücrelerin büyümesini engellediği ve apoptozu indüklediği gözlenmiştir [57].

Kafeik, ferulik, sinapik, kumarik ve sinamik asit gibi farklı fenolik asitlerle gerçekleştirilen lipokonjugat yapıların MDA-MB-231, SKOV3, MCF7, DU 145 ve HepG2 olmak üzere beş farklı kanser hücre hattına karşı sitotoksik aktiviteleri incelendiğinde antikanser özellik gösterdiği kanıtlanmıştır[58].

Sinapik asitin PC-3 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde antikanser etkileri incelenmiş ve IC50 değeri 1000 μ M bulunmuştur. Ayrıca kaspaz-3 aktivitesini önemli ölçüde artıran sinapik asitin prostat kanseri hücreleri üzerinde antikanser etkisinin olduğu düşünülmektedir[59].

2.1.1.10 Sinapik Asit Molekülünün Toksik Etkileri

Sinapik asitin toksisitesi üzerine yapılan çalışmalar genel olarak sağlıklı hücreler üzerinde toksik etki yaratmadığını göstermiştir.

Seçici fenolik bileşiklerin T47D insan göğüs kanseri hücreleri üzerindeki anti-proliferatif ve apoptotik etkileri incelendiğinde sinapik asit içeren fenoliklerin T47D hücrelerine doz bağımlı ve zaman bağımlı antiproliferatif bir etki gösterdiği bildirilmiştir [60].

İnsan nöroblastoma hücreleri (SH-SY5Y) üzerinde yapılan sinapik asit tedavisi herhangi bir sitotoksik etki oluşturmamış ve bu sonuç, sinapik asitin güvenle kullanılabileceğini göstermiştir[61].

Sinapik asitin Cu^{+2} varlığında pBR322 plasmid DNA'sındaki etkinliği araştırılmış, insan fariyelositik lösemi (HL-60) hücre proliferasyonuna karşı diğer fenolik bileşiklere göre DNA hasarında dikkate değer derecede daha etkili olduğu bulunmuştur. Ekzojen Cu^{+2} iyonlarının eklenmesi ve düşük konsantrasyonda sinapik asit miktarına bağlı olarak hücrenin proliferasyonu artmış, yüksek konsantrasyonda sinapik asit, hücre proliferasyonunu engellemiştir [62].

Gentamisin neden olduğu nefrotoksisteyi değerlendirmek için sinapik asitin renoprotektif fonksiyonları ve bu fonksiyona aracılık eden yollar incelendiğinde böbreklerde oksidatif / nitrozatif stres, iltihaplanma ve apoptozun aşağı regülasyonu yoluyla böbrek yetmezliğini ve yapısal yaralanmaları azalttığı gözlemlenmiştir [63].

Literatürde çeşitli fenolik bileşiklerin kullanıldığı nanopartiküler sistemler oldukça yaygın olup, bu çalışmaların sonucunda moleküllere ait farmakolojik özelliklerin partiküler sistemler yardımı ile genellikle daha etkili olduğu gözlenmiştir.

Dikmen ve ark. kafeik asit yüklü katı lipid nanoparçacıkların MCF-7 hücreleri üzerindeki etkilerini MTT testi ve Annexin V-PI analizi ile belirlemiş, sonuç olarak kafeik asit yüklü nanoparçacıkların serbest kafeik aside kıyasla MCF-7 hücreleri üzerindeki daha etkili olduğunu belirlemiştir [64].

Ferulik asit yüklü polimerik nanopartiküllerin hipoglisemi ve yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada nanopartiküller oral ve topikal olarak sıçanlara uygulanmış, sonuçlar ferulik asit yüklü nanopartiküllerin diyabetik sıçanlarda yara iyileşmesini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir[65].

P. aeruginosa, *E. coli*, *S. aureus* ve metisiline dirençli *S. aureus* üzerinde agar kuyu difüzyon metodu, disk difüzyon metodu ve broth mikrodilüsyon yöntemleri ile kafeik asit fenetil ester(CAPE)'in serbest ve PLGA içine enkapsüle edilmiş formları karşılaştırıldığında serbest CAPE'nin uygulanan yöntemlerin hiçbirinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı, CAPE yüklü nanopartiküllerin ise önemli antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu belirlenmiştir [66].

Ersöz ve ark. hesperetin ve hesperetin yüklü PLGA nanopartiküllerinin anti-kanser özelliklerini değerlendirdiği çalışmada polimerik nanopartiküllerin, glioblastoma hücreleri üzerinde anti-kanser aktivite ve terapötik ajanların zayıf çözünürlüğünü arttırmada büyük avantajlara sahip olduğunu göstermiştir [67].

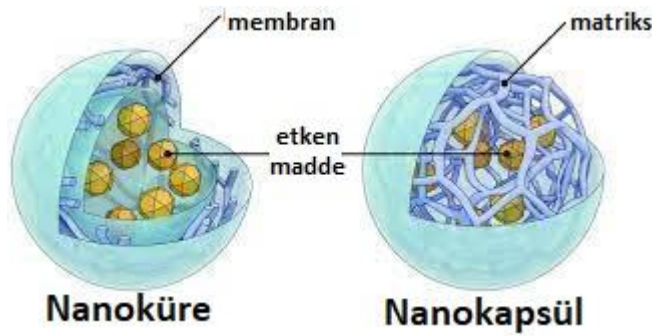
Bu tez çalışmasında suda çözünürlüğü düşük olan sinapik asit molekülünün biyolojik sistemlerde farmakolojik özelliklerini artırabilmek/iyileştirebilmek amacıyla sinapik asit molekülü nanopartiküler sisteme yüklenmiş ve molekülün nanopartiküler sistemlere yüklenmesi sonucu maddenin kontrollü salım sistemi mekanizması sayesinde dolaşım sistemi içerisinde daha uzun süre bozunmadan kalarak etkinliğini sürdürebilmesi amaçlanmıştır. Sinapik asit yüklü nanopartiküler sistemin farklı parametrelerde sentezlenerek optimize formülasyonuna ulaşılması ve optimize edilen biyoyumluluğu yüksek

partiküllerin antikanser ve antigenotoksik etkinliğinin artırılmasının hedeflendiği çalışmanın ilaç taşıyıcı sistemler için referans olabileceği düşünülmektedir.

2.3 Nanopartiküller

Nanopartiküller üzerine ilk çalışmalar 1970'li yıllarda aşı ve kanser ilaçları olarak tasarlanmaları ile başlamıştır. Kanser ilaçlarının tümör hücreleri tarafından hücre içine alınma oranlarının yükseltilmesi için çeşitli ilaç hedefleme yöntemleri geliştirilmiş, bu yöntemlerin ilk aşaması nanopartiküllerin retikuloendotelyal hücreleri (RES) tarafından reddedilmemesini sağlamak olmuştur. Bu çalışmaların ardından nanopartiküllerin oral salım sistemlerinde ve oftalmolojik alanlarda kullanımı için çalışmalar yapılmıştır [68].

Nanopartiküller üretim yöntemlerine bağlı olarak nanoküre veya nanokapsül şeklinde elde edilebilen yapılardır (Şekil 2.2)[69].



Şekil 2. 2 Nanoküre ve nanokapsül yapılarının şematik olarak gösterimi

Nanoküreler genellikle 100-200 nanometre arasında partikül büyüklüğüne sahip, etken maddenin polimer matrikste çözünme, hapsedme, enkapsülasyon veya kimyasal bağlanma yoluyla adsorbe edildiği katı, kolloidal partiküllerdir [4]. Saklama sırasında iyi bir stabilite ve uzun yarılanma ömrü sergilemeleri sayesinde nanokürelerin hedef organ veya dokulara yönelmeleri kolaylaşmaktadır[70].

Nanokapsüller yüzeyinde ya da polimerik bir membran içerisinde etken maddeyi hapsederek taşıyan kolloidal yapıda veziküler sistemlerdir. Sistem etken maddeyi solid, likit ya da moleküler dispersiyon halinde içerebilir. Nanokapsüller, kullanılan materyale ve hazırlama metoduna göre lipofilik ya da hidrofilik olabilirler [71].

Diğer kolloidal taşıyıcı sistemler ile karşılaştırıldıklarında biyolojik sıvılarda oldukça yüksek stabiliteye sahip olan polimerik nanopartiküller molekül ağırlığı düşük ilaçları ve peptid, protein gibi makromolekülleri lokalize veya sistemik olarak taşıyabilmektedir[5]. Böylece etken maddenin taşınması esnasında ortaya çıkabilecek tahribat, bozulma, metabolik hasar veya savunma sistemlerinin oluşturacağı tepkiler minimuma indirgenir. İlaç sistemlerinde etken maddelerin nanokapsüllere veya nanokürelere yüklenmesi, kontrollü ilaç salınımını sağlar. Bu nano yapılar belirli bir süre boyunca yavaş enzimatik degradasyona uğrar ve membranın dağılmasını takiben ilacın salınmasını başlatır. Genellikle, ilk patlama salımı uygulamanın erken saatlerinde meydana gelir ve daha sonra ilaç veya madde zaman içinde yavaş yavaş salınarak kontrollü salım sağlanır[72].

Partiküler sistemlerde; partikülün boyutu ve boyut dağılımı en önemli ve belirleyici özelliklerden birisidir çünkü sistemin biyolojik akibeti, toksisiteye etkisi ve ilacın hedeflendirilmesi hakkında ön fikir vermekte; ilaç yüklemesini ve salımını değiştirebilmekte, nanopartikül stabilitesi üzerinde etkili olabilmektedir[73].

Nanopartiküller yüzey-hacim oranının daha yüksek olması ve daha küçük membran gözenağı bulundurması sebebiyle mikropartiküllerle (mikrokürelere veya mikrokapsüller) karşılaştırıldığında daha avantajlıdır. Bu özellikler, enzimatik biyolojik bozunma süresini ve ilacın membrandan difüzyonunu önemli ölçüde etkilemekte, ek olarak nanopartiküller küçük çapları nedeniyle diğer ilaç sistemlerinin ulaşamadığı hücre dışı ve hücre içi alanlara nüfuz edebilmektedirler[72]. Desai ve ark. Caco-2 hücreleri ile yaptıkları çalışmada boyutları 100 nm olan nanopartiküllerin 1 µm boyutundaki mikropartiküllere göre iki buçuk kat, 10 µm boyutundaki mikropartiküllere göre ise altı kat daha fazla hücre içerisine alındığını göstermiştir[74].

2.3.1 Nanopartiküllerin Avantajları ve Dezavantajları

Nanopartiküllerin avantajlı olmasının en temel iki özelliği küçük boyutlu olmaları ve hazırlanmalarında biyomateryaller kullanılıyor olmasıdır. Küçük boyutları sayesinde nanopartiküller kapillerlerden geçerek kolayca hücre içine alınır ve hedef dokuda etkili olurlar. Biyobozunur maddeler de hedef dokudaki etkin madde salınımını uzun süren periyotlarla sağlamaktadır [75]. Bu temel iki özelliğe ek

olarak ; en küçük kılcal damarlardan dahi kolayca geçerek karaciğer, dalak, akciğer gibi organları hedef almak için kullanılabilir, fagositozdan kaçınarak kan dolaşımında uzun süre kalabilir, sistemik toksisiteyi azaltabilir, oral, nazal veya parenteral olarak uygulanabilir, yüzeylerine takılan ligandlar veya manyetik yönlendiriciler ile doku ve organlara özel hedefleme yapabilir, kontrollü salım yapabilme özellikleri sayesinde ilacın vücut dışına atılımını ve organlara dağılımını sınırlayarak terapötik etkinliğini artırır.

Nanopartiküllerin dezavantajlarına bakıldığında ise yine küçük boyutlarından kaynaklı olarak agregasyona meyilli olmaları ve yüklenebilecek ilaç miktarının sınırlı olması gösterilebilir [69]. Ayrıca nanopartiküllerin muhtemel toksik etkilerinin de olabileceği düşünülerek çeşitli araştırmalar yapılmış; boyutu 100 nm'den küçük nanopartiküllerin havada ve sıvılar içerisinde daha fazla biriktikleri için hedef organlara istenen miktarlardan daha fazla geçtikleri, büyük boyutlu nanopartiküllerin ise karaciğer eliminasyonu sebebiyle hedef organlara ulaşamadığı belirlenmiştir [76].

Başka bir çalışmada Brown ve arkadaşları inhalasyonla akciğerlere alınan küçük boyutlu (~64 nm) partiküllerin akciğer zarında hasara yol açtığını ve oksidatif stresin neden olduğu inflamasyon ile nanopartikül yüzey alanı arasında önemli bir bağlantı olduğunu bildirmişlerdir [77].

2.3.2 Nanopartiküllerde Kontrollü İlaç Salınımı

Geleneksel dozaj formlarına kıyasla oldukça fazla avantajı olan kontrollü ilaç salım sistemlerinde nanopartiküller, etken maddenin polimerik yapı içerisinde difüze bir şekilde salımını sağlar. Polimerik membran içerisinde bulunan etken maddenin polimerdeki çözünürlüğü ve difüzyon hızı salım profilinde önemli bir etkiye sahiptir. Partiküler sistem oluşturulurken yapıya eklenen yardımcı kimyasallar ve yüzeye adsorbe olabilen etken madde miktarı da salımı etkileyen faktörlerdendir.

2.3.3 Polimerik Nanopartiküller

Kullanılan materyale ve üretim şekillerine göre nanopartiküller katı lipid, metalik, polimerik nanopartiküller gibi farklı yapılarda olabilmektedirler. Polimerik nanopartiküller doğal veya sentetik polimerler ile hazırlanan partiküler sistemlerdir[78]. Polimerik nanopartiküllerin avantajlarına bakıldığında kolaylıkla

sterilize edilebilmeleri, biyolojik sıvılarda daha yüksek stabiliteye sahip olmaları, etken maddeyi parçalanmaktan korudukları için hedeflenen bölgeye ulaşma olasılığını artırmaları, etkin maddenin hedeflendirilmesini, salınımının kontrolünü ve sürdürülmesini sağlamaları, hedeflenen bölgede enjeksiyonlarını takiben, günler hatta haftalar süren etkin madde salınımına olanak vermeleri ve etkin maddenin hedef bölgede salınımını sağladıkları için, diğer organ ve dokular üzerindeki sistemik toksisitelerini azaltmaları, fizyolojik ortamda parçalanabilmeleri ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması, ilaç formlarının katı dozaj şekillerinde, uzun süre ve ilave saklama şartlarına gerek kalmaksızın saklanabilmesi gösterilebilir[75].

Polimerik nanopartiküler sistemler oluşturulurken uygun polimer seçimi oldukça önemlidir. Polimer seçiminde polimerin biyoyumluluğu, polimere ait biyobozunurluk ve toksisite derecesi, oluşturulacak ilacın fiziksel özellikleri, dozu ve salım süresi, nasıl kullanılacağı, partikülden beklenen boyut ve yüzey morfolojileri önemli rol oynar[78].

Poli(glikolik asit) (PGA), Poli(laktik asit) (PLA) ve Poli(laktid-ko-glikolid asit) (PLGA) nanopartiküler sistemlerde en çok kullanılan sentetik polimerlerdir[78].

2.3.4 Poli (laktid-ko-glikolid asit)(PLGA)

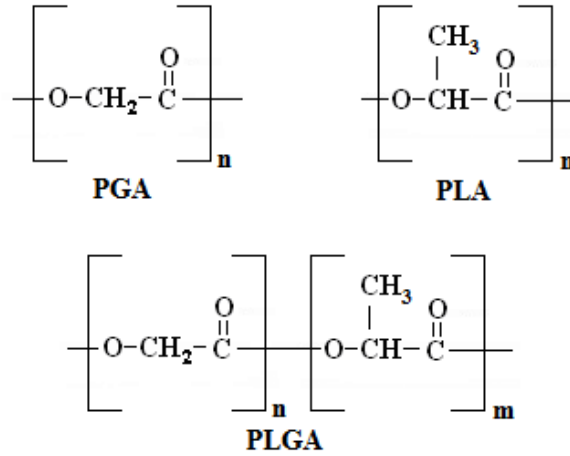
PLGA, vücutta şeker metabolizması sırasında bir ara ürün olarak bulunan laktik aside dönüştüğü için zehirli etkisi olmayan ve ilaç salım sistemlerinde oldukça yaygın olarak kullanılan ticari bir üründür.

Biyobozunur bir polimer olan PLGA özellikle doku mühendisliğinde ve ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında önemli bir potansiyele sahip olup Avrupa İlaç Ajansı (European Medicine Agency (EMA)) ve Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration; FDA) tarafından onaylı bir üründür. PLGA'nın temel avantajlarına bakıldığında farklı yapıdaki maddelerin taşıyıcı sistemlerinin hazırlanmasında kullanılabilmesi, uzun süreli klinik deneyiminin kazanılmış olması, biyoyumlu ve biyoparçalanabilir olması gösterilebilir[8].

PLGA polimeri, laktik asit ve glikolik asit monomerlerinin uygun karışımlarının polimerizasyonu ile elde edilen bir kopolimerlerdir (Şekil 2.3). Yapısında bulunan

PLA ve PGA oranları değiştirilerek, farklı molekül ağırlıklarına sahip, farklı fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikler taşıyan PLGA'lar elde edilebilmektedir. İlaç taşıyıcı sistemlerde PLGA'ların yapısal özelliklerine bağlı olarak, ilaç salımının uzatılması ve kontrolü gerçekleştirilebilmektedir[75].

PLA ve PGA polimerlerinden oluşan poliester yapıdaki PLGA kopolimerinin laktid yapısı asimetrik bir α -karbon içermekte ve D ve L olmak üzere iki optik izomeri bulunmaktadır. Sonuç olarak PLA'nın optikçe aktif olan L-laktid (PLLA) ve D-laktid(PDLA) formu bulunmaktadır. PLGA genellikle D-laktid ve L-laktid formlarının eşit oranda olduğu poli D, L-laktik-ko-glikolik asit olarak kullanılmaktadır[8].

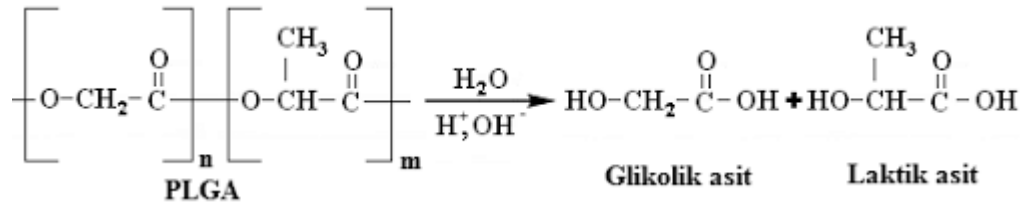


Şekil 2. 3 Poli(Laktik asit) (PLA), Poli(Glikolik asit) (PGA) ve Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) polimerlerinin kimyasal yapıları[75].

Optik olarak aktif PDLA ve PLLA'nın fizikokimyasal özellikleri hemen hemen aynıdır. Genel olarak, PLA polimeri, düzensiz polimer zincirleri nedeniyle oldukça kristal formda (PLLA) veya tamamen amorf (PDLA) yapıda olabilmektedir[79]. Poli(L-laktid) yarı-kristal yapıda iken poli(DL-laktid) yapısındaki düzensizliklerden dolayı amorf yapıdadır. PGA molekülü ise PLA'ya kıyasla oldukça kristal bir yapı göstermektedir[80]. Yapısında metil yan grubu içeren PLA, hidrofobik özelliktedir ve metil grubunun oluşturduğu sterik engelden dolayı PGA'ya göre hidrolize daha dayanıklıdır. Metil yan grubu içermeyen PGA ise % 45-55 oranında kristal yapı göstermekte ve bu yapısından dolayı birçok organik çözücüde çözünmemektedir. PLGA, glikolid ile kopolimerizasyon yapmak üzere L-laktid veya DL-laktid kullanılarak elde edilmektedir. Glikolid:laktid oranları

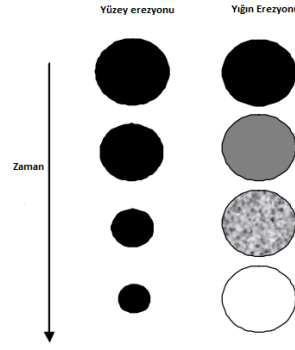
farklılaştırılarak PLGA'nın kristalinite derecesi belirlenebilmektedir[79]. Örneğin PLGA(25:75)(laktid:glükolid) amorf bir yapıda iken PLGA(80:20) (laktid:glükolid) ise yarı-kristalin yapıdadır. PLGA'nın kristalinite derecesi kopolimer zincirindeki iki monomer bileşenin molar oranlarına bağlıdır. PLGA'da, % 70'den az poli(glikolik asit) (PGA) içeren kopolimerler amorf özellikte olup klorlu solventler, tetrahidofuran, aseton diklorometan ve etil asetat gibi organik çözücülerde kolaylıkla çözünebilirler[81].

Su varlığında ester bağları üzerinden hidrolize uğratarak monomerik asitlerine parçalanarak PLGA krebs döngüsü aracılığı ile CO₂ ve su halinde vücuttan atılır. Sudaki parçalanma oranı molekül ağırlığına ve laktid:glükolid oranına bağlı olup, yüksek glükolid içeriği ve düşük molekül ağırlığı, parçalanma oranını artırmaktadır. Ayrıca kristalinite derecesi ve camı geçiş sıcaklığı (T_g)'da PLGA'nın biyoparçalanması üzerinde etkilidir[8]. Şekil 2.4'te PLGA polimerinin hidrolizi şematik olarak verilmiştir.

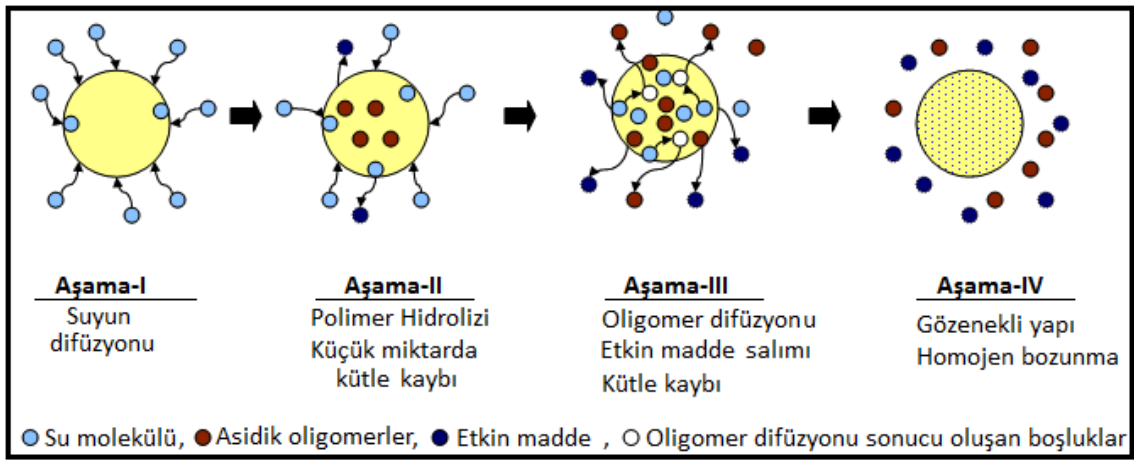


Şekil 2. 4 PLGA polimerinin hidrolizi[75].

PLGA polimeri kullanılarak üretilen polimerik nanopartiküller yığın (bulk) erzyonu veya yüzey (surface) erzyonu sonucu bozunmaktadır (Şekil 2.5). Bozunma; suyun partikül içerisine difüzyonu ile başlar ve polimerin hidrolize uğraması sonucunda asidik uç gruplara sahip oligomerlerin polimer dışına difüze olmasını takip eden etkin madde salınması ile devam eder. Bu bozunma esnasında su molekülleri oluşan boşluklardan içeri difüze oldukça oligomerler polimer dışına daha fazla çıkmakta ve polimerik matriks yüksek oranda gözenekli bir yapıya dönüşmektedir. Dolayısı ile zamanla bozunma daha yavaş ve homojen bir şekilde ilerlemektedir (Şekil 2.6) [82].



Şekil 2. 5 Yüzey ve yığın erazyonunun zamana bağlı şematik gösterimi [82].



Şekil 2. 6 PLGA nanopartiküllerinin bozunma aşamaları[75].

2.3.5 Nanopartiküller ile Sürfaktanların Etkileşmesi

Sürfaktan maddeler hidrofilik bir baş ve hidrofobik bir kuyruktan oluşmakta ve hava ile suyun birleştiği yerde yoğunlaşarak yüzey gerilimini azaltmaktadırlar. Nanopartiküllerin beklenen farmakolojik özelliklerini gösterebilmeleri için boyutu ve boyut dağılımı, etkin madde salımını yapabileceği yüzey gerilimi gibi fizikokimyasal yapıları oldukça önemlidir. Nanopartiküllerin sentezi esnasında kullanılan çeşitli surfaktanlar bu fizikokimyasal özellikleri oluşturmada etkin rol oynarlar. Ayrıca surfaktanlar polimeri içeren yağ fazını, su fazından ayırmakta, emülsiyonu stabil hale getirmekte, agregasyonu önlemekte ve enkapsülasyon verimi ile ilaç salınımını artırmaktadır. Sürfaktanların partikülleri stabilize edebilmeleri yapılarındaki amfilik özelliklerden dolayıdır. Hidrofilik baş kısımları emülsiyonun su fazına çekilirken, hidrofobik kuyruk yapıları yağ fazına çekilmekte ve partikül yapıda stabilizasyon sağlanmaktadır[83].

Polivinil alkol (PVA) hidrofilik yapıda, toksisitesi düşük, biyouyumluğ u yüksek bir polimer olup, bu özelliklerinden dolayı çeşitli ilaç sistemlerinde, yara örtü materyallerinde, yapay organ veya kontakt lens gibi biyomedikal uygulamalarda oldukça yaygın kullanılmaktadır. PVA'nın polimerik nanopartiküllerin üretiminde en çok tercih edilen surfaktan olmasının sebebi kolloidal bir stabilizan yapı sağlamasındandır[84].

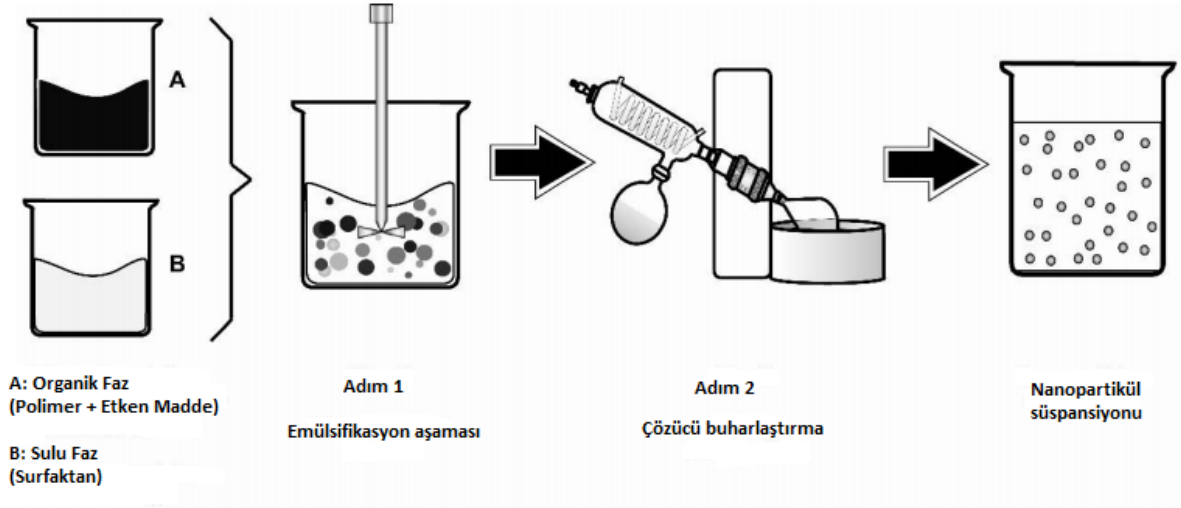
2.3.6 Nanopartikül Üretim Yöntemleri

Nanopartiküllerin hazırlama yönteminin seçilirken, kullanılan polimerin fizikokimyasal yapısı ve etkin maddenin çözünürlüğü önemli rol oynamaktadır. Polimerik nanopartiküllerin üretiminde; emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma, emülsifikasyon/çözücü difüzyon, tuzla çöktürme (salting-out), nano çöktürme (nanopresipitasyon), süperkritik sıvı teknolojisi ve diyaliz olmak üzere altı temel yöntem kullanılmaktadır[75]. Sinapik asit yüklü nanopartiküllerin hazırlanmasında emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılacağından bu yöntem detaylı olarak anlatılacaktır.

2.3.6.1 Emülsifikasyon/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Emülsifikasyon –çözücü buharlaştırma yöntemi tekli emülsiyon ve ikili emülsiyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi genellikle hidrofobik moleküllerin etken madde olarak kullanıldığı partiküler sistemleri oluşturmada kullanılan bir yöntemdir. Yöntem iki temel adımı içerir ; birincisi, suda çözünmeyen polimerin ve etken maddenin uçucu bir organik çözücü içerisinde çözünmesinden oluşur. İkinci adım ise polimer ve etken maddenin(yağ fazı) surfaktan içeren sulu faz içinde (su fazı) emülsifiye (o/w) edilmesine dayanmaktadır. Partiküler sistemler oluşturulurken başlarda diklorometan ve kloroform sıklıkla kullanılmış, zamanla toksisite kaygıları oluştuğ u için etil alkol, aseton gibi organik çözücülere geçilmiştir. Sistem su içinde yağ fazını içerecek şekilde emülsifiye edilirken (oil in water-o/w) ultrasonikasyon uygulanır ve ardından oluşan emülsiyon oda sıcaklığında sürekli olarak karıştırılarak veya düşük basınç altında buharlaştırılarak partikül oluşumu sağlanır (Şekil 2.7) [85].

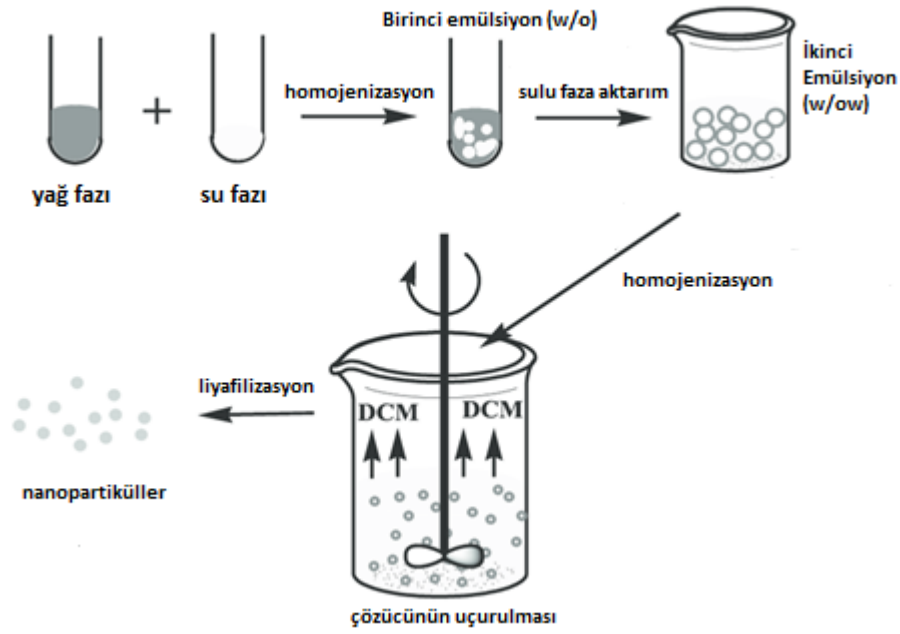


Şekil 2. 7 Tekli emülsiyon solvent uçurma yöntemi ile nanopartikül hazırlanmasına ait şematik gösterim[85].

Oluşan partiküller stabilizatör ve serbest halde bulunan etken maddenin fazlalığını gidermek için saf su ile yıkanarak birkaç kez santrifüj edilir. Santrifüj sonrası kalan su liyofilize edilerek uzaklaştırılır ve böylece katı nanopartiküller elde edilir[85, 86].

Sovan ve ark. emülsiyon oluşumunda ve sonrasında partiküler sistemi etkileyen faktörleri etken maddenin yapısı ve çözünürlüğü, polimer konsantrasyonu, moleküler ağırlık ve tip, etken madde /polimer oranı, kullanılan organik çözücü, kullanılan stabilizatör konsantrasyonu ve türü, emülsiyonlaştırma işleminin hızı ve sıcaklığı, dağınık ve sürekli fazların hacmi ve viskoziteleri şeklinde belirtmişlerdir[87].

İkili emülsiyon çözücü uçurma yöntemi hidrofilik moleküller olan peptid, protein veya benzer makromolekülleri enkapsüle etmek için kullanılan bir yöntemdir. Yöntem iki adımdan oluşmaktadır. Birinci adımda suda çözünebilir yapıda olan etken madde suda çözünür (w_1) ve organik solvent içerisinde çözülmüş olan polimere (o) eklenerek birincil emülsiyonu (w_1/o) oluşturmak üzere homojenize edilir . Daha sonra, birincil emülsiyon, çift emülsiyon ($w_1/o/ w_2$) oluşturmak için uygun stabilizatör içeren sulu faz ile emülsiyon haline getirilir. İkili emülsiyon oluşumunu takiben emülsiyon oda sıcaklığında sürekli olarak karıştırılarak veya düşük basınç altında buharlaştırılarak partikül oluşumu sağlanır (Şekil 2.8) [88].



Şekil 2. 8 İkili emülsiyon solvent uçurma yöntemi ile nanopartikül hazırlanmasına ait şematik gösterim[89].

Oluşan partiküller stabilizatör ve serbest halde bulunan etken maddenin fazlalığını gidermek için saf su ile yıkanarak birkaç kez santrifüj edilir. Santrifüj sonrası kalan su liyofilize edilerek uzaklaştırılır ve böylece katı nanopartiküller elde edilir.

Her iki yöntemde de emülsifikasyon prosesi, mekanik karıştırma, sonikasyon ya da yüksek basınçlı homojenizasyonla gerçekleştirilebilmektedir[90].

2.3.7 Nanopartiküler Yapıların Hücre ile Etkileşimi

Nanopartiküller fonksiyonel özellikleri sebebiyle biyolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır[7]. Nanopartiküller ilaç dağıtımı, hücre ve doku mühendisliği, medikal görüntüleme gibi aşamalarda teşhis ve tedavi amaçlı olarak kullanılıyor olsa da bu tür uygulamalar için özgül, etkin ve spesifik olarak hedeflenmiş, hücrelerin hızla içine alabileceği nanopartiküllere ihtiyaç duyulmaktadır. Hücre içine ilaç alımı esnasında nanopartiküllerin çökmesi, kan sirkülasyonunda yarı ömürlerinin kısa olması, düşük verimlilik, nonspesifik hedefleme gibi bazı sınırlayıcı faktörler bulunmaktadır[91]. Yüksek toksisiteye sahip olmaları ve nonspesifik olarak hem normal hem kanserli hücrelerde birikmeleri, düşük çözünürlük ve sınırlanmış stabiliteden dolayı

biyoyumluluk sağlayamamaları, kısa yarı ömürleri ile vücuttan hızla uzaklaştırılmaları gibi sınırlayıcı pek çok faktörden dolayı güncel antikanser ajanlar kanser tedavisinde önemini yitirmektedir[92]. Hedef hücrelere ulaşabilmeleri için çeşitli maddeler ile modifiye edilen nanopartiküller kontrollü salım yapabilmeleri, biyobozunur olmaları ve çok küçük boyutlu olmaları sebebiyle kan akışı esnasında makrofajlar tarafından yok edilmeden hedef doku veya organlara ulaşabilmektedirler [93].

2.4 Nanopartikül Karakterizasyonunda Kullanılan Cihazlar

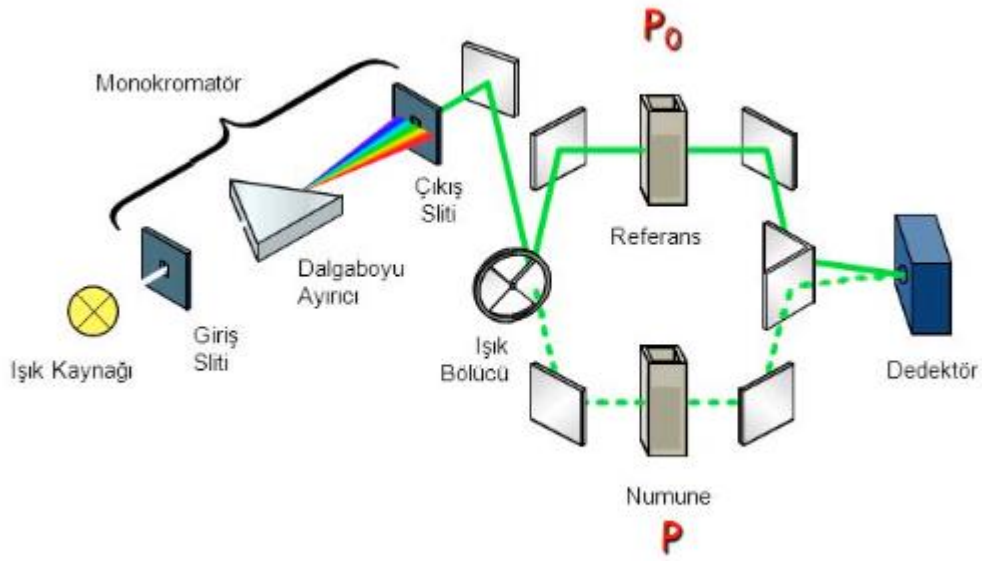
Nanopartiküllerin karakterizasyonu ilaç özelliklerinin tam anlaşılması ve geliştirilebilmesi için oldukça önemlidir. Nanopartiküllere ait enkapsülasyon etkinliği, ilaç yükleme verimi, partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve morfolojisi gibi karakteristik özellikler;UV spektroskopisi, zeta potansiyel, fourier dönüşümlü kızılötesi(FT-IR) spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir.

2.4.1 UV-Vis Spektrofotometre

Ultraviyole(mor ötesi) görünür spektroskopisi (UV-Vis), ultraviyole ve görünür spektral bölgelerin bir kısmında absorpsiyon spektroskopisi veya yansıtma spektroskopisi anlamına gelir. Elektromanyetik spektrumun bu bölgesinde örneğin yapısında bulunan çeşitli atomlar ve moleküller elektronik geçişlere uğrarlar. 100-700 nm aralığı elektronik spektrum, 100-200 nm aralığı vakum UV, 200-400 nm aralığı UV ve 400-700 nm aralığı ise görünür bölge olarak adlandırılır ve görünür bölgede absorpsiyon yapan bileşik absorbladığı rengin tamamlayıcı renginde görünür[94].

UV-Vis spektrofotometrelerinde cam veya kuvars prizmalar bulunur ve cihaz kullanılırken ışığın herhangi bir frekansta UV veya görünür bölgesi seçilerek ölçüm alınır. Işık örnekten veya örnek maddeyi içeren çözeltilerden geçerek absorpsiyon veya geçirgenlik hakkında bilgi verir. UV-Vis spektrofotometre cihazlarında ışık kaynağı olarak döteryum (D₂), tungsten (W), hidrojen (H₂), ksenon (Xe), civa buhar lambası gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır. Bunlardan en uygun olanı hidrojen ve tungsten lambalardır.

Spektrofotometreler tek ve çift ışık yollu olarak ikiye ayrılırlar. Tek ışık yollu spektrofotometrelerde, bileşenlerin tümü aynı ışık yoluna yerleştirilmiş iken çift ışık yollu spektrofotometrelerde(Şekil 2.9) monokromatörden çıkan ışık, eşit şiddette iki demete bölünür ve biri örneğe diğeri ise sadece çözücünün bulunduğu kaba gönderilir. İkiye ayrılan ışık, iki farklı dedektör tarafından algılanır ve dedektörlerde oluşan sinyallerin oranı ölçülerek örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olur.



Şekil 2. 9 Nanopartikül karakterizasyonunda kullanılan çift ışık yollu UV-spektrofotometrenin şematik gösterimi

Spektrofotometrik cihazların çoğu ölçüm esnasında ışığı sadece hedef moleküllerle değil aynı zamanda çözelti ile de etkileşime sokar. Dolayısıyla cihaz hedef molekülün absorpsiyon spektrumunu değil, çözeltinin spektrumunu verir. Bu nedenle hedef molekül türünün absorpsiyonunu öğrenmek için kör (blank) alınır.

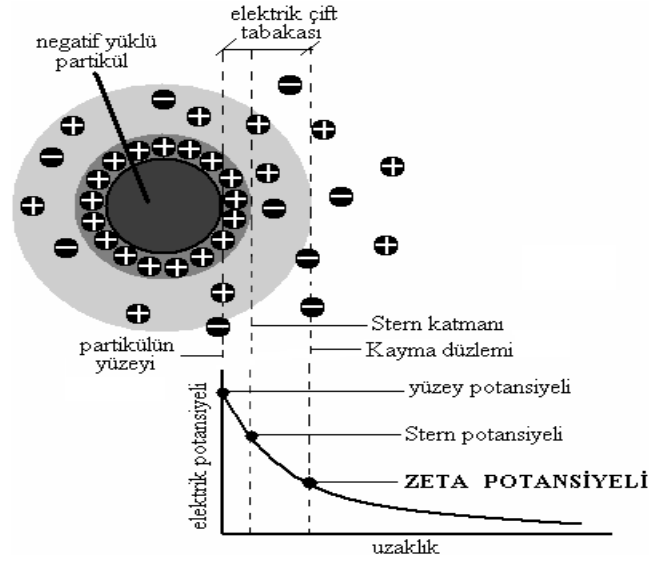
Biyolojik moleküllerin konsantrasyon ve saflık tayininde UV absorplama özelliklerinden yararlanır. Bu absorpsiyon daha çok moleküllerdeki bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanmakta ve bunun sonucu olarak UV-Vis Spektroskopisi bir moleküldeki fonksiyonel grupların tanımlanmasında ve aynı

zamanda fonksiyonel grupları taşıyan bileşiklerin nicel tayininde kullanılabilir[90, 95].

Beer-Lambert yasası, bir çözülden geçen ışık miktarının, çözelti içinde kat ettiği mesafe ve çözeltinin konsantrasyonu ile ters orantılı, emilen ışık miktarı ile doğru orantılı olduğunu belirtir. Nicel analiz yapabilmek için standart çözeltilerin bilinen derişimlerine karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilen doğruya kalibrasyon doğrusu denir. Nicel analiz, kalibrasyon doğrusunun doğrusal olduğu bölgede yapılır. Derişimi bilinmeyen örneğin absorbans değeri ölçülür ve kalibrasyon doğrusunda bu değere karşılık gelen derişim saptanır[96].

2.4.2 Zeta Sizer (Parçacık Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçüm Cihazı)

Zeta potansiyel, nanopartiküllerde kolloidal dispersiyonların dayanıklılığı hakkında bilgi veren ve partiküllerin yüzey yüklerinin oluşturduğu potansiyelin dolaylı olarak ölçümünü sağlayan bir karakterizasyon yöntemidir. Çift iyon tabakası teorisine göre ölçümü yapılan zeta potansiyelde negatif yüklü partiküllerin etrafında iki ayrı bölge bulunur, bunlardan birincisi Stern Tabakası olarak bilinir ve partikül yüzeyine çok yakın bir şekilde sınırlanmış yüksek derişimde zıt (pozitif) iyonlardan oluşur(Şekil 2.10). Stern tabaka ve dağılımlı tabaka arasındaki iyon dağılımı ortamda potansiyel farkın oluşmasına neden olur. ± 30 mV ile ± 10 mV arasındaki zeta potansiyel değerleri, agregasyonu önleyen, partiküller arasındaki yüksek itiş gücü nedeni ile daha dayanıklı nanopartikül dispersiyonlarını göstermektedir. Kolloidlerin kararlılığı ile partiküller arasındaki itme çekme kuvvetini belirleyen zeta potansiyeli arasında güçlü bir korelasyon vardır. Zeta Sizer cihazı, belirli bir potansiyel altında hareketi sağlayan tanelerin hızını belirleyerek zeta potansiyelini hesaplamaktadır[73, 90, 97].

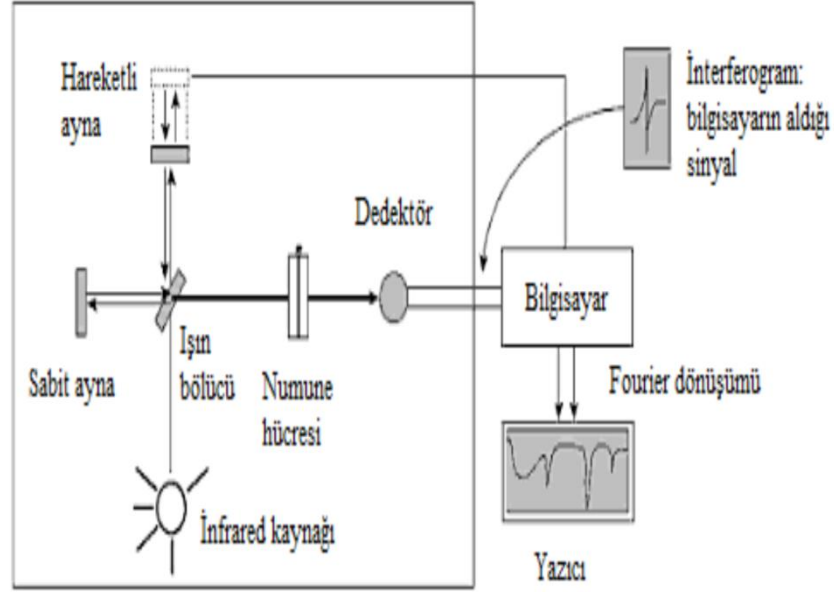


Şekil 2. 10 Zeta potansiyel şematik gösterimi

Zeta potansiyel ölçümü dışında nanopartiküllerin boyut analizi de Zeta Sizer cihazı ile gerçekleştirilmektedir. Nanopartikül boyutu sadece etken madde salımı ve bozunma özelliklerinin belirlenmesinde değil; aynı zamanda, etken maddenin doku ile etkileşimi ve hücre içerisine alımı açısından da önemli rol oynamaktadır

2.4.3 FT-IR

FT-IR spektroskopisi matematiksel Fourier dönüşüm yöntemi ile ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen bir kimyasal analitik yöntemdir. FT-IR spektroskopisi; infrared ışık kaynağı, ışın bölücü ve dedektörden oluşmaktadır. Işık kaynağından çıkan ışın, ışın bölücü ve sabit ve hareketli aynalardan oluşan interferometreden geçerek ikiye ayrılmakta, aynalar yardımıyla tekrar ışın bölücüye gelen ışının bir kısmı numuneden geçerek absorplanmaktadır. Absorplanma sonrası numuneden çıkıp dedektöre ulaşan ışın, numune tarafından absorplanan kısmının belirlenmesi amacıyla referans olarak kullanılan bir lazer ışınıyla karşılaştırılır ve sonuç olarak elde edilen interferograma bilgisayar aracılığıyla Fourier dönüşümü uygulanarak numuneye ait FT-IR spektrumu elde edilir (Şekil 2.11) [90].



Şekil 2. 11 FTIR şematik gösterimi

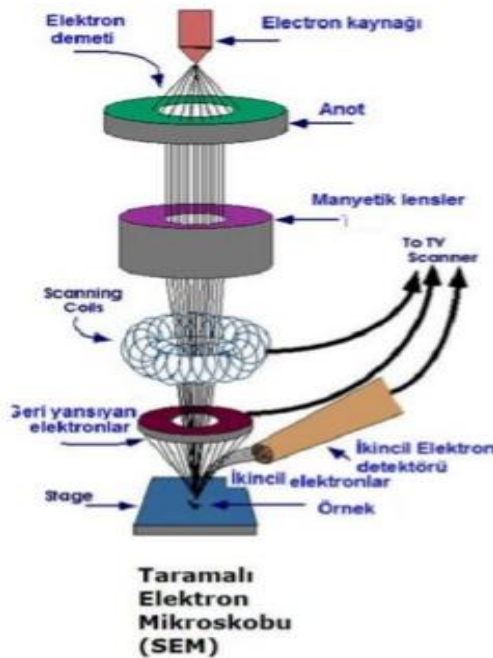
Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 14000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasında olup yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; $4000\sim 14000\text{ cm}^{-1}$), orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; $4\sim 400\text{ cm}^{-1}$) olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır. Kızılötesi bölgede kimyasal olarak belirgin ve tekrarlanabilir biyokimyasal parmak izlerini oluşturan organik bileşenlerin tanımlanmasını sağlayan MIR bölgesinde $3600\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ aralığına, 'fonksiyonel gruplar bölgesi', $1200\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ aralığına ise 'parmak izi bölgesi' denilmektedir. Dolayısıyla bu bölgedeki bantlar ile protein, nükleik asit gibi makromoleküller ve hücre duvarına ait bileşenler belirlenebilir [98, 99].

$1200\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki parmak izi bölgesi moleküllere ait küçük yapıları ve yapıda meydana gelen değişikliklerin incelenmesinde kullanılmaktadır. Yapıda meydana gelen küçük değişiklikler, bu bölgede görülen absorpsiyon piklerinin büyük oranda yer değiştirmesine sebep olduğu için bu bölgede iki ışık dizisinin çakışması, bu iki ışık dizisinin aynı maddeye ait olduğunu gösterir. Tekli organik bağların büyük bir kısmı bu bölgede absorpsiyon bantları vermektedir. Bölgenin oldukça dar olması ve enerjilerinin birbirine çok yakın olmasından ötürü bu bölgedeki titreşim frekansları birbirini fazlasıyla etkilemektedir. Bu etkileşimlerden dolayı maddelerin ışık dizilerinde görülen absorpsiyon bantları

kompozit bantlar olup sadece tek bir bağ frekansından kaynaklanan saf bir absorpsiyon bandı değildir. Işık dizisinin en karmaşık kısmı olmasına rağmen FT-IR analizinde maddeye ait karakteristik bilgi yine bu bölgeden elde edilebilmektedir. MIR bölgesi ile birlikte infrared bölgenin tamamına bakılarak FT-IR'da detaylı bir okuma yapılabilir, ayrıca madde miktarlarıyla orantılı olarak kızıl ötesi ışık dizisindeki bantların yoğunluğu değiştiği için kantitatif analiz de yapılabilir[100].

2.4.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM); yüzeyi, odaklanmış bir elektron ışını ile tarayarak numunenin görüntülerini üreten bir elektron mikroskobu türüdür. Elektronlar ile numune atomları etkileşime girer ve oluşan çeşitli etkileşimler uygun alıcılarda toplanarak sinyal güçlendiricilerden geçirilir. Daha sonra sinyal güçlendiriciden geçen ışınlar katot ışınları tüpünün ekranına aktararak yüzey topografyası ve numunenin bileşimi hakkında bilgi içeren görüntüler elde edilir(Şekil 2.12). Taramalı elektron mikroskobu ile incelenen cisim 300.000 kat büyütebilir, atomik boyutlara kadar görüntü alınabilir.



Şekil 2. 12 Taramalı elektron mikroskobu şematik gösterimi[101].

SEM'in çalışma prensibinde incelenecek örnek elektron mikroskobuna yerleştirildikten sonra ortamın vakuma alınması söz konusudur. Burada vakumun amacı elektronların herhangi bir yere saçılmadan doğrudan hedefe yani örneğe ilerlemesini sağlamaktır. Manyetik mercekler elektronların odaklanmasını sağlarken, diyafram açıklığı odak uzunluğunu ayarlar[101].

Elektron ışını raster tarama düzeninde taranır ve ışının konumu, bir görüntü üretmek için algılanan sinyalin yoğunluğu ile birleştirilir. En yaygın SEM modunda, elektron ışını tarafından uyarılan atomların yaydığı ikincil elektronlar, Everhart-Thornley dedektörü kullanılarak tespit edilir. Tespit edilebilecek ikincil elektronların sayısı ve dolayısıyla sinyal yoğunluğu, diğer şeylerin yanı sıra, örnek topografyasına bağlıdır[102].

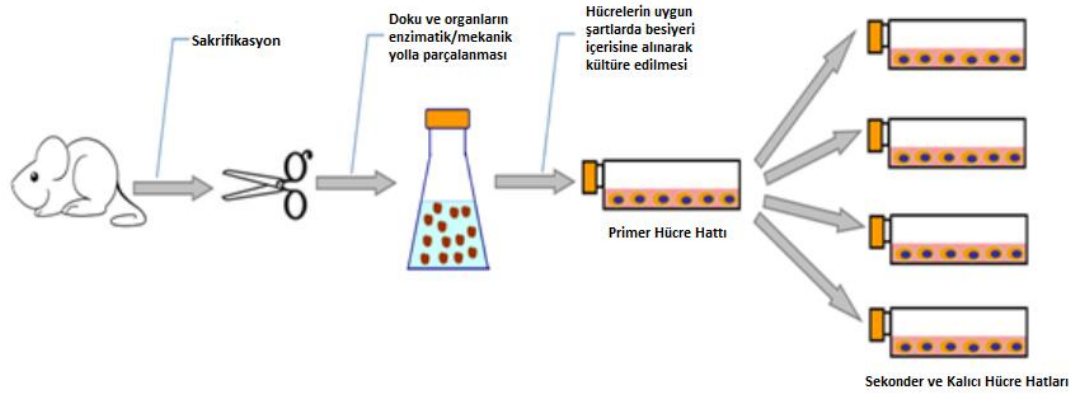
2.5 Hücre Kültürü

Belirli bir hücrenin bir organ veya dokudan izole edilerek *In vitro* ortamda, uygun şartlara adapte edilmesine hücre kültürü denilmektedir. Çeşitli canlıların çeşitli dokularından elde edilen dokular parçalanarak hücreler açığa çıkarılır ve içerisinde temel aminoasitler, mineraller, proteinler bulunan özel besiyerlerinde, steril şartlarda, 37 °C'de yapışkan yüzeylere tutunarak üremesi sağlanır. Hücre kültürü çalışmalarında amaç, izole edilen hücrelerde canlılık devamını sağlayarak hücreleri çoğaltmak ve çeşitli araştırmalarda kullanabilmektir[103].

Hücre kültüründe kullanılan hücre hatları primer, sekonder ve devamlı hücre hatları olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Primer hücre hatları, doku ya da organdan izole edilen ilk hücrelerin kültüre alınması olup bu hatlar enzimatik ya da mekanik yollarla elde edilebilirler. Elde edilen hücreler içerisinde besiyeri bulunan şişelere inoküle edilir ve şişe yüzeyine yapışarak hücreler çoğalmaya başlar. Bu hücrelerde metabolik aktivite oldukça yavaştır ve maksimum 8-9 pasaj kadar hücre üretimi olabilir. Ayrıca taze dokudan alındıkları için kontaminasyon riskinin en yüksek olduğu hücre tipleridir.

Sekonder hücre hatları, primer hücre kültüründen elde edilip 50-100 pasaj kadar çoğaltılabilen ancak belli bir zaman sonra üreme yeteneğini kaybeden hücre hatlarıdır. Bu hücre hatları genellikle fibroblastoid hücre tiplerinden oluşmaktadır.

Devamlı hücre hatları ise bölünme yeteneğini kaybetmeyen, sonsuz bölünebilme özelliğine sahip hücrelerin oluşturduğu hatlardır. Genellikle tümör dokusundan veya kimyasal olarak transformasyona uğramış hücrelerden alınarak kültüre edilirler ve bu nedenle normal hücrelere ait genotip ve fenotip özelliklerini göstermezler. Normal hücre kültürünün en az elli alt kültürü yapıldıktan sonra devamlı hücre kültürü hatları oluşturulabilir. Şekil2.13'te primer, sekonder ve devamlı hücre hatlarının şematik olarak gösterimi verilmiştir[103].



Şekil 2. 13 Hücre hatlarının şematik gösterimi[103].

2.5.1 L929 Fibroblast Hücre Hattı

Ana L suşu, 1948 yılında 100 günlük erkek C3H fare areolar ve yağ dokusundan türetilen L929 fare fibroblast hücre hattı, ana suşun 95. alt kültür üretiminden oluşturulmuştur. Yumuşak doku kültürü olan bu hücreler, fibroblast olarak günümüzde *In vitro* çalışmalarda en çok kullanılan hücre hattı modelidir[104].

2.5.2 C6 Glioma Hücre Hattı

İlk kez 1968 yılında Benda ve ark. tarafından N, N'-nitrozometilüre'ye maruz bırakılarak yetiştirilmiş Wistar-Furth sıçanlarından elde edilen ve yeni doğan sıçan beyneine enjekte edildiklerinde morfolojik olarak glioblastoma multiforme'ye (GBM) benzer özellikler gösteren C6 hücre hattı terapötik girişimlere dirençli en agresif gliomadır ve bu nedenle glioblastom tedavisinde ilaç etkileşim çalışmalarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadırlar[105].

2.5.3 MTT Testi

[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] (MTT) testi 1980 yılında Mosmann tarafından geliştirilmiş, hücre canlılığı ve çoğalmasının saptanmasında altın standart haline gelen bir sitotoksosite analiz yöntemidir. Yapısında bulunan tetrazolyum bileşiğinin canlı hücrelerin mitokondrilerinde meydana gelen dehidrogenazlar tarafından suda çözünmeyen formazan kristallerine enzimatik dönüşümü sonucu indirgeyici aktivite açısından hücre canlılığı ölçülmektedir[106]. Sitotoksitenin değerlendirilmesinde oldukça yaygın olarak kullanılan enzimatik yöntemlerden biri olan MTT testinin prensibi MTT'yi mavi, çözünmeyen formazan bileşiğine dönüştürebilen dehidrogenaz enzim aktivitesine bağlıdır. Reaksiyon mitokondriyal süksinil dehidrogenaz tarafından katalize edilmekte ve hücrelere uygulanan maddenin toksik etkisi nedeniyle dehidrogenaz aktivitesinin etkilendiği koşullarda mavi renkli formazan oluşmamaktadır. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmekte ve optik yoğunluğun ölçülmesi ile belirlenmektedir[107, 108].

Başlangıçta, yıkama basamağı içermeyen protokole zamanla formazan kristallerinin sulu ortam içinde çözdürülebilmesi için sırayla dimetilformamid (DMF) ilavesi, hafif aspirasyon ile fazla boya atılması, PBS ile yıkama gibi basamaklar eklenmiş, ardından DMSO'da formazan kristallerinin çözdürülmesi bu testin basitliğini ve hassasiyetini artırmıştır[106].

Canlı hücre mitokondrisinde bulunan oksidatif enzimlerin tetrazolyum halkasını parçalaması sonucu sarı renkli MTT boyası mor formazan kristallerine dönüşmekte, böylece ölü ve canlı hücreler spektrofotometrik olarak belirlenebilmektedir.

2.5.4 Genotoksosite

DNA, genetik bilginin nesilden nesile aktarılmasını sağlayan kalıtsal bilgidir. DNA bazları üzerinde bulunan polar gruplar arasında spesifik olarak oluşan hidrojen bağları ile çift sarmal yapılı DNA oluşmaktadır ve DNA'nın fonksiyonu bu gruplara bağlıdır. Çeşitli reaktif moleküllerin hedefi olan DNA, hasara duyarlılığı yüksek, çok kolay zarar görebilen bir moleküldür[109, 110]. DNA hasarı normal DNA

metabolizması sırasında kendiliğinden veya çevresel faktörlerin etkisiyle oluşabilmektedir. DNA hasarının en önemli nedeni bazların kimyasal yapısında kendiliğinden meydana gelen değişimlerdir[111]. DNA bazlarında bulunan polar gruplar arasında oluşan kimyasal değişiklikler replikasyon sırasında yanlış eşleşmeye ve mutasyona neden olur. Deoksiriboz fosfat iskeletinde oluşan kopmalar ise replikasyonu bloke etmenin yanı sıra aşırı miktarlarda oluştuğunda hücre ölümüne yol açabilmektedir. Her bir insan hücresinin DNA'sında günde yaklaşık olarak 104 adet kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olan hasar meydana gelmektedir[109, 111]. DNA hasarına yol açan çevresel faktörler, fiziksel veya kimyasal ajanlar olabilmektedir. Fiziksel ajanların başında gelen iyonizan radyasyon ve UV ışınları gelirken, kimyasal ajanların başında alkilleyici maddeler, nitröz asid, platinyum türevleri gibi çapraz bağlayıcılar ve sitokrom P450 sistemi ile metabolize edilen ksenobiyotikler gelmektedir. Bu ajanlar, DNA hasarını bazları alkilleyerek, oksitleyerek, aralarında çapraz bağlanmalar oluşturarak veya zincir kırıklarına neden olarak oluştururlar. Ayrıca DNA üzerinde yaklaşık 23 adet oksidatif baz hasarı bulunmaktadır. Oksidatif DNA hasarı metabolizma esnasında gerçekleşen bazı tepkimelerde oksijen radikalleri tarafından endojen olarak veya radyasyon ve çeşitli kimyasallar ile eksojen gerçekleşebilir ve DNA zincir kırıkları oluşturabilirler[109]. DNA'da oluşan hasar düşük seviyede ise DNA onarım mekanizmaları tarafından onarılabılırken, orta dereceli hasarlar çoğunlukla mutasyonla sonuçlanır. Ağır hasarlar ise hücre ölümüne sebep olan apoptotik mekanizmaları uyarırlar[112]. DNA hasarının doku fonksiyonlarının bozulması ile ortaya çıkan hastalıkların etyolojisinde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. DNA hasarı günümüzde çeşitli dejeneratif hastalıkların izlenmesinde, kemoterapi ve radyoterapi ilaçların takibinde, radyasyon aracılı genotoksisitenin belirlenmesinde biyoloji belirteç olarak kullanılabilmesi nedeniyle DNA hasarının hassas bir şekilde ölçülmesini sağlayan teknikler günümüzde büyük önem kazanmıştır.

Günümüzde ilaçlar, gıda katkı maddeleri, çeşitli tarım ilaçları gibi kimyasal madde kullanımını her alanda hızla artmaktadır. Bu nedenle bu maddelerin insan genomunda olumsuz etkileri olup olmadığının tespit edilmesi son derece önem kazanmıştır[113]. Hücre DNA'sında hasara veya genetik mutasyonlara neden olan

mutajenik veya kanserojenik ajanlar genotoksik etmenler olarak bilinir[114]. Bu ajanlar bireyin kendisini ve sonraki jenerasyonları etkileyebilecek anormallikler ortaya çıkarabilir. Bu nedenle çeşitli ajanların genotoksik etkilerinin araştırılmasında farklı canlı gruplarını kapsayan test metotları geliştirilmiştir. Bu metotlar, bir kimyasalın potansiyel mutajen veya kanserojen olup olmadığının belirlenmesinde kullanılmakta ve çeşitli maddelerin mutasyonlara, kromozom anormalliklerine veya DNA hasarlarına sebep olup olmadığını belirlemektedir[115].

Genotoksitenin belirlenmesinde farklı canlı gruplarını kapsayan çeşitli in vivo ve in vitro test sistemleri kullanılmaktadır. Bu testler kromozomlarda meydana gelen değişimler, gen mutasyonları ve DNA hasarları gibi parametreler kullanılarak uygulanmaktadır. Bu parametrelere bağlı olarak genotoksisite çalışmalarında sıklıkla ; Bakteriyel Geri Mutasyon Testi (AMES), Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz İleri Mutasyon Tesi (HPRT), Kromozom Anormalliği (KA) Testi, Mikronükleus (MN) Testi, Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi, Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ve Comet Testi kullanılmaktadır [113].

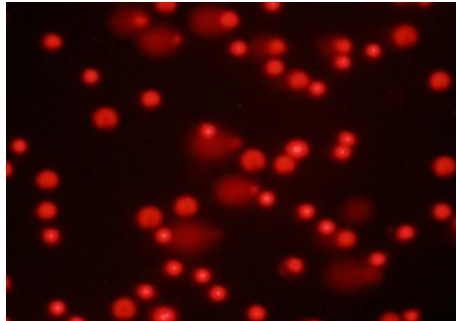
2.5.5 Comet Assay Testi

DNA hasarını hücre düzeyinde saptamak ve miktarını belirlemek için uygulanan non-invaziv, hızlı, hassas, floresan mikroskobik bir yöntem olan “Comet Assay” tekniği tek hücreli jel elektroforezi olarak da bilinmektedir[109, 110]. İlk kez 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından spesifik bir hücredeki DNA hasarı belirlenmiştir[116]. Sonraki yıllarda hasar tespitinin hassasiyetini artırmak için mikro jel elektroforez tekniği geliştirilmiş ancak nötral koşullarda uygulanan elektroforez çift sarmal kırıklarını tespit edebilirken, tek sarmal kırıklarını tespit edememiştir. DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan, DNA çift sarmalından çok, DNA tek sarmalında hasar meydana getirdiği için Singh ve ark. elektroforezi alkali ortamda uygulayarak bu sorunu çözmüşlerdir[117, 118]. Günümüzde Singh ve ark. tarafından geliştirilen, tek ve çift zincir kırıklarını tanımlayabilen metot Comet Assay olarak uygulanmaktadır[109, 118]. Bu metotta kullanılan güçlü lizis koşulları

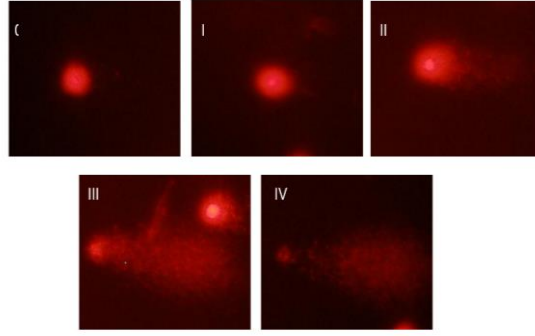
proteinlerin %95'inden fazlasını yok edilebilmekte, böylece hücrelerin hemen hemen hepsinde DNA hasar büyüklüğü direkt olarak tespit edilebilmektedir[110].

Teknikte temel amaç, tek tek hücrelerin nükleuslarını inceleyerek genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreler üzerindeki etkilerini tespit etmektir. Genel olarak, canlı bir dokudan izole edilen nükleuslu DNA, ince bir agaroz jel içine sabitlenip, zarların parçalanıp çekirdekte bulunan süperkoil DNA'nın serbestleşmesi için lizis işlemine tabi tutulur(lizis işlemine serbestleşen DNA ışığa karşı duyarlıdır. Bu basamaktan sonra ilave kırıklar oluşmaması için işlemler karanlık odada, gece lambası ışığında yürütülmelidir). Alkali ortamda süperkoil yapının gevşeyerek açılması ve kırıkların ortaya çıkması sağlandıktan sonra uygulanan elektroforetik ortamda yürütülür. Genotoksik ajanlardan dolayı DNA'da tek veya çift zincir kırıkları oluşabilir ve buna bağlı olarak farklı ağırlık ve elektrik yüküne sahip DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler. Elektroforez sonunda etidyum bromür gibi DNA'ya özgü boyalar kullanılır ve hasarın derecesine göre dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar değişen, farklı derecelerde ortaya çıkan DNA görüntüleri floresan mikroskop altında incelenir. Etidyum bromür oldukça kanserojen bir boya olduğu için günümüzde daha sağlıklı bir boya olan SyberGreen kullanılmaya başlamıştır[114, 119, 120].

Görüntüleme sonucunda, hasarlanan hücre DNA'ları(Şekil 2.14) hasarın derecesine göre beş kategoride değerlendirilmektedir. Buna göre hiç hasarlanmamış DNA lar "O", çok az hasarlanmış DNA lar "I", az hasarlı DNA lar "II", hasarlı DNA lar "III" ve çok hasarlı DNA lar "IV." derece hasar olarak değerlendirilir(Şekil 2.15) [121].



Şekil 2. 14 DNA hasarınının floresan mikroskop altındaki genel görüntüsü [121].



Şekil 2. 15 Elektroforez ortamında negatif kutuptan pozitif kutuba (soldan sağa) doğru göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA görüntüleri. 0- Hasarsız DNA; I-Çok az hasarlanmış DNA; II-Az hasarlanmış DNA; III-hasarlanmış DNA; IV-tümüyle hasarlanmış DNA [121].

Genotoksisite çalışmaları dışında, Comet Assay Yöntemi ile farklı tiplerde DNA hasar çalışmaları yapılabilmektedir. Örneğin Gedik ve ark. hasara spesifik DNA onarım enzimleri kullanarak çeşitli baz modifikasyonlarının sıklığını belirlemeyi başarmışlardır [122]. Apoptotik ve nekrotik hücreler nötral veya alkali ortamda uygulanacak elektroforez ile belirlenebilir. Bazı araştırmacılar yaptıkları görüntü analizleri sonucunda bir takım karakteristik görüntülere dayanarak apoptotik hücrelerin nekrotik hücrelerden comet assay ile kolayca ayrılabilirdiği sonucuna ulaşmışlardır. Apoptotik hücrelerin küçük başı ve yelpaze şeklinde kuyruğu oluşurken, nekrotik hücrelerin ise geniş baş ve değişik uzunluklarda dar bir kuyruğa sahip olduğu belirtilmiştir[123-125]. Kolay, ucuz, hızlı ve non-invaziv bir yöntem olduğu ve çok düşük miktarlardaki kan örneklerinde dahi uygulanabildiğinden Comet Assay yöntemi özellikle çeşitli biyolojik süreçlerin izlenmesinde, çevresel değişikliklerin, sperm kalitesi, ozon ve kemoterapi gibi ilaçların canlı sistemlere etkisinin belirlenmesinde kullanılmaktadır[109].

3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Hassas Terazi – Shimadzu
- Saf Su Cihazı – Sartorius
- Manyetik Karıştırıcı – Variomag Mono
- Vorteks – Velp Scientifica
- pH Metre - Hanna
- Ultrasonik Su Banyosu – Bandelin Sonorex
- Peristaltik Pompa – Masterflex Core Palmer
- Sonikatör – Bandelin Sonoplus
- Çoklu Manyetik Karıştırıcı – IKA
- Santrifüj Cihazı – Beckman Coulter Allegra X-30 R
- UV-Vis Spektrofotometre – Shimadzu UV-1800
- Zeta Sizer – Malvern ZEN 3600 Nano ZS
- FT-IR – Thermo Scientific Nicolet iS10
- Liyofilizatör – Telstar Cryodos
- Invert Mikroskop – Olympus
- CO₂ İnkübatör – Biosan, ES20
- Biyogüvenlik Kabini – Hedlab XPROII
- Mini Santrifüj Cihazı – Hermle Z 206 A
- Floresan Mikroskop – ZEISS AxioVert01
- Elisa Reader – BioTek PowerWave XS2
- Elektroforez Tankı – Cleaver Scientific nanoPAC-300P
- Taramalı Elektron Mikroskobu – ZEISS EVO LS10
- Çalkalayıcı – Biosan Environmental Shaker ES20

3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

- Sinapik Asit- Sigma 85429
- Poli(laktik-ko-glikolik asit) PLGA – Sigma 719870
- Polivinil Alkol –Sigma Aldrich 363138
- Etil Alkol – Merck
- Diklorometan - Merck
- Monosodyum Fosfat (NaH_2PO_4) – Sigma Aldrich 04270
- Disodyum Fosfat Dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) – Sigma Aldrich 04272
- Sodyum Klorür (NaCl) – Sigma Aldrich 13423
- Hidroklorik Asit (HCl) – Sigma Aldrich 30721
- Sodyum Hidroksit (NaOH) – Sigma Aldrich 71690
- Dulbecco's Medified Eagle Medium / F-12 Nutrient Mixture (Ham) (DMEM/F-12 / 1:1 / 1X) – Gibco 1906042
- L-glutamine 200mM (100X) – Gibco1881732
- Penisilin-Streptomisin(PEST) – Sigma P4333
- Fetal Sığır Serumu – Gibco 08G5259K
- Tripsin EDTA – Multicell 325043156
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) – ChemCruz sc358801 / Carlo Erba 508001
- Tripan Mavisi – Sigma T8154
- Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide %98 (MTT) – Sigma M5655
- Agaroz (HMA) – Sigma A9539
- Low Melting Agarose (LMA) - Sigma A9539
- Etilendiamintetraasetik Asit Disodyum Salt – Sigma E5134
- Trizma Baz – Sigma T1503
- Triton X – Sigma T8787
- Trizma Hidroklorid – Sigma T5941
- Syber Green – İnvitrogen S33102

3.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

3.3.1 Nanopartikül Hazırlamada Kullanılan Çözeltiler

3.3.1.1 Farklı Konsantrasyonlarda Sinapik Asit Çözeltisi Hazırlanması

1 mg Sinapik Asit 10 ml etil alkolde çözülerek 0,1 mg/ml oranında çözelti elde edildi ve bu çözelti seyreltilerek 0,02 mg/ml - 0,0001 mg/ml konsantrasyonları arasında çözeltiler hazırlandı. Çözeltiye ait λ_{max} değeri UV-Vis spektroskopisinde belirlendikten sonra farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin UV şiddetlerinden kalibrasyon eğrisi çıkartıldı.

Suda çözünürlüğü çok düşük olan sinapik asit molekülüne ait suya karşı kalibrasyon eğrisi değerlerini belirleyebilmek için 2,5 mg Sinapik Asit 250 ml suda çözülerek 0,01 mg/ml oranında çözelti elde edildi ve bu çözelti seyreltilerek 0,01 mg/ml - 0,000125 mg/ml konsantrasyonları arasında çözeltiler hazırlandı. Çözeltiye ait λ_{max} değeri UV-Vis spektroskopisinde belirlendikten sonra farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin UV şiddetlerinden kalibrasyon eğrisi çıkartıldı.

3.3.1.2 Polivinilalkol (PVA) Çözeltisi Hazırlanması

%3'lük polivinilalkol çözeltisi elde etmek için; 3 g polivinilalkol tartıldı ve üzerine 100 ml saf su eklenerek manyetik karıştırıcıda 65-75 °C'de homojen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı ve filtre kağıdı ile süzüldü.

%1,5'lük polivinilalkol çözeltisi elde etmek için; 1,5 g polivinilalkol tartıldı ve üzerine 100 ml saf su eklenerek manyetik karıştırıcıda 65-75 °C'de homojen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı ve filtre kağıdı ile süzüldü.

%0,1'lik polivinilalkol çözeltisi elde etmek için; 0,1 g polivinilalkol tartıldı ve üzerine 100 ml saf su eklenerek manyetik karıştırıcıda 65-75 °C'de homojen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı ve filtre kağıdı ile süzüldü.

3.3.1.3 0,01 mol/L'lik Fosfat Tamponu (PBS) Hazırlanması (pH=7,4)

1,1998 g NaH₂PO₄, 1,7799 g Na₂HPO₄ ve 5,85 g NaCl tartılarak üzerine 1 L saf su eklendi ve manyetik karıştırıcıda homojen bir çözelti elde edilene kadar karıştırıldı. Çözeltinin pH'ı 7,4'e ayarlandı.

3.3.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

3.3.2.1 DMEM/F12 Tamamlanmış Besiyeri Hazırlanması

Ticari olarak alınan besiyeri içerisine hacminin %1'i kadar 200 mM Penisilin-Streptomisin ve L-Glutamin eklendi. C6 Glioma hücreleri için %5, L929 Fibroblast hücreleri için %10 FBS (Fetal Sığır Serumu) eklendi. Hücre kültürü çalışmalarında tamamlanmış besiyeri kullanıldı.

3.3.2.2 Hücre Dondurma Solüsyonu Hazırlanması

Hücre dondurma solüsyonu stok olarak %90 tamamlanmış besiyeri ve %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) içerecek şekilde hazırlandı ve küçük hacimlere bölüştürülerek -20°C'de saklandı.

3.3.2.3 MTT Solüsyonu Hazırlanması

MTT solüsyonu 0,6 mg/ml MTT olacak şekilde hazırlandı. 6 mg MTT molekülü 10 ml PBS'te çözülerek filtreden geçirildi. Hazırlanan solüsyon +4°C'de karanlık ortamda bekletildi.

3.3.3 Genotoksisite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

3.3.3.1 Agaroz Çözeltilerinin Hazırlanması

Genotoksisite deneylerinde kullanılmak üzere düşük (LMA) ve yüksek (HMA) erime sıcaklığına sahip iki farklı agaroz çözeltisi kullanıldı.

Yüksek erime sıcaklığına sahip agaroz (HMA) çözeltisi %0,65'lik olarak hazırlandı. 0,65 g HMA'ya 100 ml saf su eklenerek mikrodalgada ısıtıldı ve çözülmesi sağlandı. Hazırlanan çözelti lamaların kaplanması için kullanıldı.

Düşük erime sıcaklığına sahip agaroz (LMA) çözeltisi %0,65'lik olarak hazırlandı. 0,65 g LMA'ya 100 ml PBS eklenerek mikrodalgada ısıtıldı ve çözülmesi sağlandı. Hazırlanan çözelti kullanılmaya kadar 37°C'de bekletildi.

3.3.3.2 Lizis Çözeltisi Hazırlanması

Stok çözelti için; 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma Baz kullanılarak saf su ile homojen çözelti hazırlandı ve pH'ı 10'a ayarlandıktan sonra hacmi 890 ml'ye tamamlanıp +4°C'de saklandı.

Çalışma çözeltisi hazırlanırken; Stok solüsyona 100 ml DMSO ve 10 ml Triton-X eklendi.

3.3.3.3 Elektroforez Çözeltisi Hazırlanması

Stok çözeltiler için;

40 g NaOH tartıldı ve üzerine 100 ml saf su eklenerek 10 N NaOH çözeltisi hazırlandı.

14,89 g EDTA tartılarak üzerine 200 ml saf su eklendi ve 200 mM'lık çözelti hazırlandı.

Çalışma çözeltisi;

Stok çözeltilerden 30 ml NaOH ve 5 ml EDTA çözeltisi alınarak içerik 1 L'ye tamamlandı ve pH'ı 13'ün üzerine çıkartılacak şekilde ayarlandı.

3.3.3.4 Nötralizasyon Çözeltisi

63,04 g Tris-HCl tartıldı ve 1 L saf su ile manyetik karıştırıcıda homojen çözelti olana kadar karıştırıldı. Çözelti pH'ı 7,5 olacak şekilde ayarlandı.

3.3.3.5 Boyama Çözeltisi

10.000X konsantre halde satın alınan Sybr Green boyası DMSO ile 1X'e seyreltikten sonra 1:5 oranında saf su ile seyreltildi ve boyama işleminde kullanıldı.

3.4 Deneysel Metodlar

3.4.1 Sinapik Asit Molekülünün Kalibrasyon Eğrileri

1 mg Sinapik Asit 10 ml etil alkolde çözülerek 0,1 mg/ml oranında çözelti elde edildi ve bu çözelti seyreltilerek 0,02 mg/ml -0,0001 mg/ml konsantrasyonları arasında çözeltiler hazırlandı. Çözeltiye ait λ_{max} değeri UV-Vis spektroskopisinde 323 nm olarak belirlendikten sonra bu dalga boyunda farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin UV şiddetlerinden kalibrasyon eğrisi çıkartıldı.

Suda çözünürlüğü çok düşük olan sinapik asit molekülüne ait suya karşı kalibrasyon eğrisi değerlerini belirleyebilmek için 2,5 mg Sinapik Asit 250 ml suda çözülerek 0,01 mg/ml oranında çözelti elde edildi ve bu çözelti seyreltilerek 0,01

mg/ml - 0,000125 mg/ml konsantrasyonları arasında çözeltiler hazırlandı. Çözeltiye ait λ_{max} değeri UV-Vis spektroskopisinde 306 olarak belirlendikten sonra bu dalga boyunda farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin UV şiddetlerinden kalibrasyon eğrisi çıkartıldı.

Maksimum enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesini belirleyebilmek için sinapik asit molekülü farklı oranlarda ve farklı parametreler ile nanopartiküller sistemlere yüklendi, elde edilen veriler doğrultusunda çalışılan moleküle uygun optimize formülasyon dizayn edildi. Yapılan çalışmalar sonucunda reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği, ilaç yükleme kapasitesi, boyut ve zeta potansiyel değerlerinin en ideal olduğu koşullar seçilerek hücre kültürü çalışmaları ve genotoksisite deneylerinde kullanılmak üzere optimize nanopartiküller sentezlendi.

3.4.2 Sinapik Asit Yüklü Nanopartikül Sentezi

Sinapik Asit molekülü tartıldı ve 1 ml diklorometan (DCM) + 0,5 ml etil alkolde çözüldü. PLGA molekülü 0,5 ml DCM içerisinde çözüldü. Oluşan çözeltiler birbirine karıştırılarak vortekslendi ve organik fazı hazırlamak amacıyla 5 ml %1,5 polivinil alkol (PVA) çözeltisi üzerine peristaltik pompa ile 5 ml/dk akış hızında, %80 güçte, 90 saniye sonike edilerek eklendi. Oluşan emülsiyon dış fazı oluşturmak üzere 35 ml %0,1'lik PVA üzerine peristaltik pompa ile 2 ml/dk akış hızında eklenerek manyetik karıştırıcıda 800 rpm'de 2 saat karıştırıldı. 2 saatin sonunda çözeltiden katı nanopartikül elde edebilmek ve PVA'yı uzaklaştırmak için çöktürme ve yıkama işlemi yapıldı. Çöktürme işlemi 10000 rpm'de 40 dk +4 °C'de santrifüj yapılarak gerçekleştirildi. Çöktürme işlemi sonrası yıkama için pellet üzerine 35 ml saf su eklenerek 10000 rpm'de 30 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı ve bu işlem 4 kez tekrar edildi. Yıkama sonrası elde edilen nanopartiküller 10 ml saf su içinde homojen çözelti haline getirildi ve liyofilizatörde kurutulmak üzere -20 °C'de donduruldu.

3.4.3 Sinapik Asit Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyonu için UV spektroskopisi kullanılarak indirekt yöntemle enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasiteleri hesaplandı, Zeta Sizer ile boyut, dağılım ve zeta potansiyel analizi, Taramalı

Elektron Mikroskobu (SEM) ile boyut analizi, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ile kimyasal bağ analizi yapıldı, optimize nanopartiküle ait *In vitro* salım çalışması 30 gün boyunca takip edildi.

3.4.3.1 Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması

Nanopartikül içerisine yüklenen etken madde miktarını belirlemek için üst fazdan indirekt tayin metodu kullanıldı. Çöktürme ve yıkama işlemi sonrası elde edilen üst fazlar toplanarak UV spektroskopisinde ölçüm alındı. Ölçüm sonucunda üst fazda bulunan ve suya karşı 306 nm'de absorbans piki verdiği bilinen sinapik asit miktarı hesaplanarak nanopartikül içerisine yüklenmemiş olan madde miktarı hesaplandı. Belirlenen miktar başlangıç miktarından çıkarıldı ve enkapsüle edilen madde miktarı belirlendi.

Enkapsülasyon Etkinliği (%EE) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı[67] ;

$$\%EE = \frac{\text{Nanopartikül içinde bulunan etken madde miktarı (mg)}}{\text{Kullanılan toplam etken madde miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.4.3.2 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması

Liyafilizatörde kurutularak elde edilen katı nanopartikül miktarının sentezde kullanılan toplam katı madde miktarına oranlanması ile reaksiyon verimi elde edildi.

Reaksiyon Verimi (%RY) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı[67] ;

$$\%RY = \frac{\text{Üretilen nanoapartikül miktarı (mg)}}{\text{Polimer+Etken madde miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.4.3.3 İlaç Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması

Üst fazların toplanması sonucunda UV-spektroskopisi ile indirekt olarak hesaplanan enkapsüle madde miktarının liyafilizatörden alınan katı nanopartikül miktarına oranlanması ile ilaç yükleme kapasitesi hesaplandı.

İlaç Yükleme Kapasitesi (%DL) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı[67] ;

$$\%DL = \frac{\text{Enkapsüle edilen etken madde miktarı(mg)}}{\text{Elde edilen katı nanopartiül miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.4.3.4 Zeta Sizer Analizi

Nanopartiküllere ait ortalama parçacık boyutu (Z-Ave), zeta potansiyel ve polidispersite indeksi (PDI) değerleri Dinamik Işık saçılması yöntemi ile belirlendi. Analizler 4,0 mV He-Ne lazer lamba (633 nm) ile donatılmış Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) cihazında 0.8872 cP viskozite ve 1.330 kırılma indeksi değerleri kullanılarak $\pm 0,1$ °C hassasiyeti ile 25 °C'de 3 tekrarda gerçekleştirildi.

3.4.3.5 SEM Analizi

Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda, Carl-Zeiss EVO LS10 taramalı elektron mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilen SEM analizi nanopartiküllere ait yüzey morfolojisi ve şekilleri belirlemek amacı ile yapıldı. Yüksek vakum altında altın tabaka ile kaplanan nanopartiküller 5 kV'de 60.000X büyütme ile analiz edildi.

3.4.3.6 FT-IR Analizi

Serbest sinapik asit molekülü, PLGA polimeri ve sinapik asit yüklü polimerik nanopartiküllere ait fonksiyonel grupların tayini yapılırken Thermo Scientific Nicolet iS10 cihazı kullanıldı, numuneler doğrudan ATR (Attenuated Total Reflectance) ataçmanı kullanılarak 3 tekrarlı olarak analiz edildi.

3.4.3.7 *In vitro* Salınım Hesaplanması

Üretilen optimize nanopartiküllerin *In vitro* salınımını inceleyebilmek için katı nanopartiküller PBS tamponunda (pH=7,4) süspanse edilerek 37 °C' de, 200 rpm'de yatay olarak çalkalamaya bırakıldı. Örnekler belirli sürelerde 10000 rpm'de, 20 dk, +4 °C'de santrifüj edilerek üst fazları toplandı ve UV-spektrofotometrede 306 nm'de ölçüm alındı. Absorbans değerlerinden salınan sinapik asit miktarı hesaplandı ve bu işlem 45 gün tekrar edildi.

3.4.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında ATCC'den temin edilen ve sıvı azotta dondurularak saklanan C6 Glioma(ATCC-CCL-107) ve L929 Fibroblast (ATCC-CCI-01) hücre hatları (Şekil 3.5) kullanıldı. Öncelikle dondurulmuş olan hücreler sıvı azot tankından çıkarılarak su banyosunda çözündü ve 15 ml tamamlanmış besiyeri

içeren falkon tüp içerisine alındı. Besiyerindeki hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısım atıldı. Pellet üzerine tamamlanmış besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı ve hücrelerin homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Flask içerisine 5 ml tamamlanmış besiyeri koyularak üzerine 10^5 hücre/ml hücre süspansiyonu eklendi. Flask, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Işık mikroskopunda incelenen hücrelerin flask yüzeyini yeterli oranda kapladığı aşamada pasajı yapıldı. Pasaj yapılırken öncelikle flaskta bulunan besiyeri atıldı ve flask PBS tamponu ile yıkandı. Yıkanan flaskta hücreleri yapışkan yüzeyden kaldırmak için tripsin eklendi ve yüzeyden ayrılan hücreler tamamlanmış besiyeri ile bir falkon tüpe aktarılarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı, pellet oluşturan hücreler üzerine yeniden tamamlanmış besiyeri eklenerek hücrelerin homojen dağılımı sağlandıktan sonra eşit miktarda yeni flasklara aktarıldı. Flasklar 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre devam etti.

3.4.4.1 Hücre Sayımı

Pasaj esnasında hücre pelletinin sayımı yapıldı. Hücre sayımında ; Eppendorf tüp içerisine besiyeri ile karıştırılmış olan süspansiyon hücreden 20 µl alınıp üzerine 20 µl tripan mavisi boyası eklenerek (1:1 karışım) hafifçe pipetaj yapıldı, boya ve hücre karışımı Thoma lamında bulunan sayım alanlarına aktarıldı. Işık mikroskobu altında hücre sayımı yapıldı; canlı hücreler renksiz, ölü hücreler mavi olarak gözlemlendi. İlgili alanlardaki canlı hücre sayısı belirlendikten sonra hücreler yeni flasklara 10^5 hücre/ml şeklinde eklendi. Sitotoksosite ve genotoksosite testleri için gerekli hücre sayısı yine bu yöntemle belirlendi. Thoma Lamı'nda hücre sayımı yapılırken ;

$$\text{Hücre Sayısı} = A \times DF \times 10^4$$

eşitliği kullanılarak 1 ml'de bulunan hücre sayısı hesaplandı. Bu eşitlikte ;

A :Thoma laminın her bir karesinde sayılan ortalama canlı hücre sayısını,

DF:Thoma lamına koymadan önce tripan mavisi ile karıştırılan hücre süspansiyonunun "dilüsyon faktörünü" temsil etmektedir.

3.4.4.2 MTT Yöntemi ile Sitotoksosite Analizi

MTT sitotoksosite analizi farklı konsantrasyonlardaki serbest sinapik asit ve NP ile C6 Glioma ve L929 Fibroblast hücre hatlarında 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası uygulandı. Çalışmada her bir hücre hattı için 2 adet 96 kuyucuklu steril pleyt kullanıldı, 10^4 hücre/ml olacak şekilde tüm kuyulara hücreler ekildi. Prolifere olması için 24 saat inkübatörde bırakılan hücreler morfolojik olarak incelendi ve sitotoksik analizlerini yapmak üzere serbest sinapik asit molekülü ve optimize sinapik asit yüklü nanopartiküller fibroblast hücre hattı için 50-100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralığında, glioma hücre hattı için ise 50-100-150-200-250-300-350-400-450-500 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralığında hücrelere uygulandı. Kontrol grubu hücrelere herhangi bir etken madde uygulanmadı. 24. ve 48. saatlerde ilgili pleyt içerisindeki tüm kuyucuklardan besiyeri çekildi, 50 μl MTT solüsyonu eklenerek 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası MTT solüsyonu çekilerek yerine 100 μl DMSO eklendi, Elisa okuyucu cihazında 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbans ölçümü yapıldı. Deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Alınan ölçümlerin her biri için % olarak canlılık oranı hesaplandı. Hücrelerdeki canlılık oranının %50'den düşük olması maddenin hücreler için toksik olması anlamına gelmektedir. Hesaplama yapılırken ;

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{OD}_{570\text{e}}/\text{OD}_{570\text{b}}) \times 100 \text{ eşitliği kullanıldı.}$$

$\text{OD}_{570\text{e}}$: 570 nm'de örneklerin verdiği absorbans değeridir.

$\text{OD}_{570\text{b}}$: 570 nm'de kontrol grubunun verdiği absorbans değeridir.

3.4.4.3 Comet Assay Yöntemi ile Genotoksosite Analizi

Comet Assay çalışması C6 Glioma hücre hattı üzerinde MTT testi ile belirlenen IC50 değeri sonucu etkili dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda gerçekleştirildi. Çalışmada 6 kuyucuklu steril pleyt kullanıldı, 10^6 hücre/ml tüm kuyulara ekilerek 24 saat inkübatörde bırakılan hücrelere genotoksik analizlerini yapmak üzere serbest sinapik asit molekülü ve optimize sinapik asit yüklü nanopartiküller uygulandı. 24. ve 48. saatlerde ilgili pleyt içerisindeki tüm kuyucuklardan besiyeri çekildi, kuyucuklar PBS tamponu ile yıkandıktan sonra seyreltik tripsin ile hücreler

kaldırılıp 1 ml düşük erime sıcaklığına sahip agaroz ile karıştırılarak yüksek erime sıcaklığına sahip agaroz ile kaplanmış lamlara yayılarak lamalar lamel ile kapatıldı. 10-15 dk +4 °C'de, karanlıkta bekletilen lamalar lizis solüsyonuna koyularak yine +4 °C'de ve karanlıkta 1 saat bekletildi. Lizis işleminden sonra lamalar soğuk elektroforez tamponu ile dolu elektroforez tankına (Cleaver Scientific nanoPAC-300P) yerleştirilerek 24 V, 300 mA'de, 20 dk yürütüldü. Elektroforezin ardından lamalar nötralizasyon tamponu içerisinde 15 dk bekletildi, lameller kurutulduktan sonra örnek ile aynı hizada 75 µl SyberGreen eklenerek boyandı ve floresan mikroskopta (ZEISS AxioVert01) görüntüleme yapıldı.

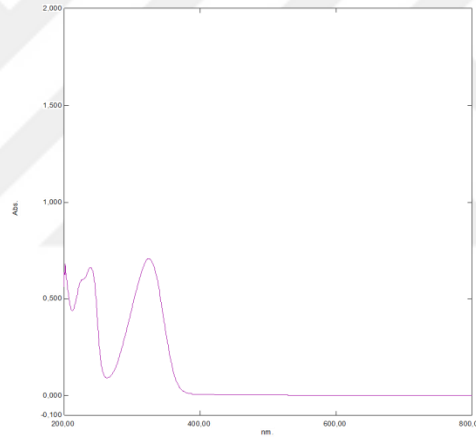
Görüntüleme esnasında her lamdan rastgele seçilen en az 50 hücre sayılarak kuyruk yoğunluğu (tail intensity ; TI), kuyruk uzunluğu (tail length ; TL) ve kuyruk momenti (tail moment ; TM) belirlendi, DNA hasarının varlığı ve oranı Image-J programı yardımı ile incelendi. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.4.5 İstatistiksel Analizler

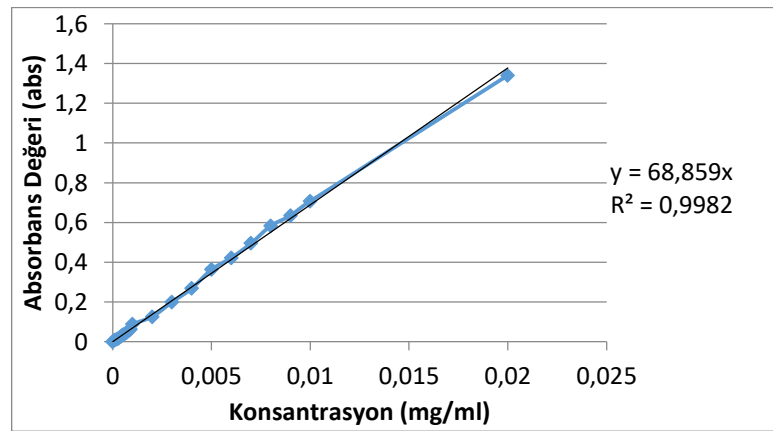
Tüm sonuçlar Graphad Prism 8.0.2 programı ile analiz edildi. Sonuçlar Mann-Whitney testi ile değerlendirilerek $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. MTT ve Comet Assay testi sonuçları Mann-Whitney testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

4.1 Sinapik Asit Molekülüne Ait UV-Vis Spektrumları ve Kalibrasyon Eğrileri

1 mg Sinapik Asit molekülü 10 ml etil alkolde çözülerek 0,1 mg/ml oranında çözelti elde edildi ve bu çözelti seyreltilerek 0,02 mg/ml-0,0001 mg/ml konsantrasyonları arasında seri çözeltiler hazırlandı. Çözeltiye ait λ_{\max} değeri UV-Vis spektroskopisinde 323 nm olarak belirlendikten sonra bu dalga boyunda farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin UV şiddetlerinden kalibrasyon eğrisi çıkartıldı. Şekil 4.1'de Sinapik asitin etil alkolde karşı 323 nm'de UV spektrumu, Şekil 4.2'de ise 323 nm'ye karşı alınan seri çözeltilerden oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi verilmiştir.

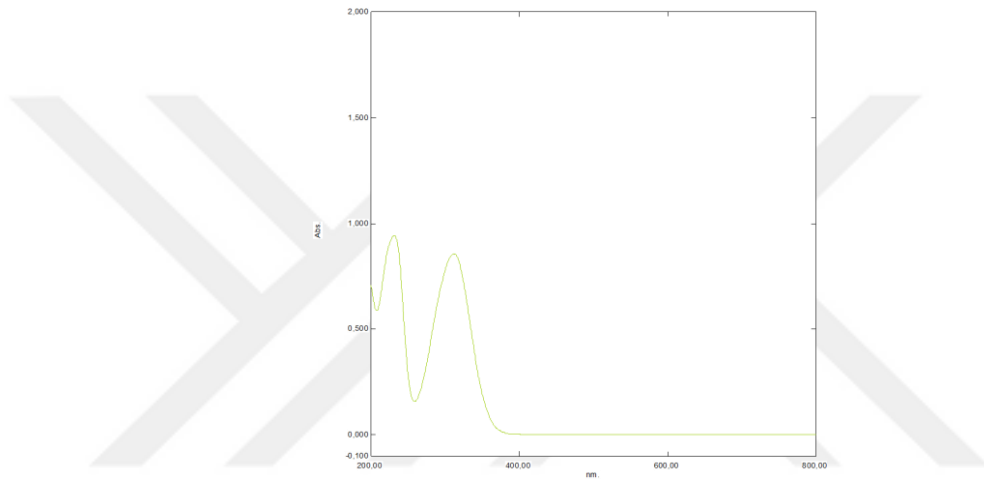


Şekil 4. 1 Sinapik asit molekülünün etanole karşı UV spektrumu

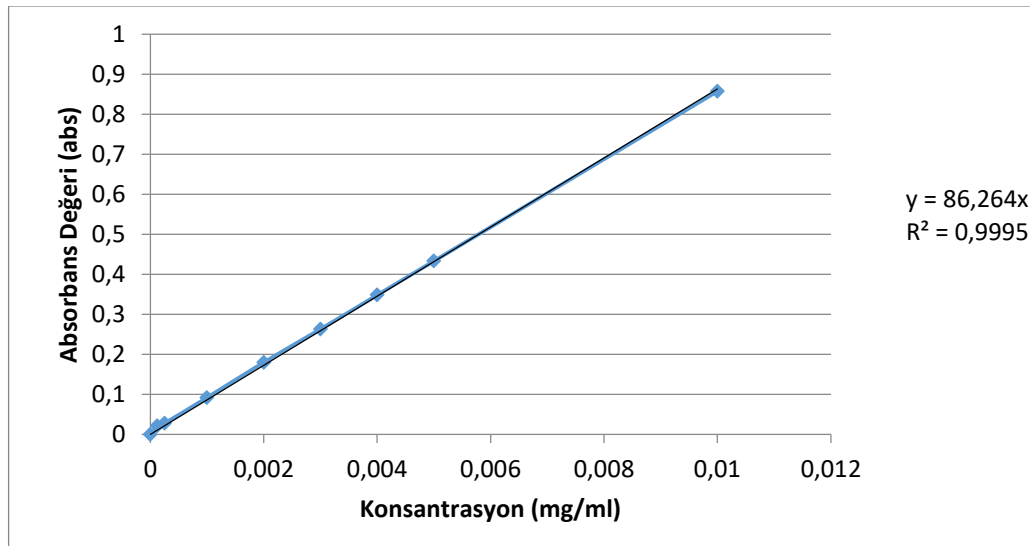


Şekil 4. 2 Sinapik asitin etil alkolde karşı hazırlanmış kalibrasyon eğrisi

Suda çözünürlüğü çok düşük olan sinapik asit molekülüne ait suya karşı kalibrasyon eğrisi değerlerini belirleyebilmek için 2,5 mg Sinapik Asit 250 ml suda çözülerek 0,01 mg/ml oranında çözelti elde edildi ve bu çözelti seyreltilerek 0,01 mg/ml-0,000125 mg/ml konsantrasyonları arasında çözeltiler hazırlandı. Çözeltiye ait λ_{\max} değeri UV-Vis spektroskopisinde 306 olarak belirlendikten sonra bu dalga boyunda farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin UV şiddetlerinden kalibrasyon eğrisi çıkartıldı. Şekil 4.3'de Sinapik asitin suya karşı 306 nm'de UV spektrumu, Şekil 4.4'de ise 306 nm'ye karşı alınan seri çözeltilerden oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi verilmiştir.



Şekil 4. 3 Sinapik asit molekülünün suya karşı UV spektrumu



Şekil 4. 4 Sinapik asitin suya karşı hazırlanmış kalibrasyon eğrisi

4.2 Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Parametreler ve Sonuçlar

Kalibrasyon eğrileri oluşturulduktan sonra nanopartikül sentezlerine başlanmış, Tablo 4.1’de verilen parametrelerde 22 farklı sentez yapılmıştır.

Tez kapsamında sentezlenen ve deneysel çalışmalarda kullanılan sinapik asit yüklü polimerik nanopartiküller tekli emülsiyon (w/o) çözücü uçurma yöntemi ile sentezlenmiştir. Nanopartiküllere ait sonuçlar Tablo 4.1’de verildiği gibidir.

Farklı parametrelerin denenmesinde amaç minimum boyutta maksimum ilaç verimine ve enkapsülasyon etkinliğine sahip optimize partiküllere ulaşmak olmuştur.

Kullanılan sinapik asit ve polimer miktarı, surfaktan oranı ve miktarı, organik çözücülerin hacmi, sonikasyon süresi ve gücü belirli oranlarda değiştirilerek optimize partiküller elde edilmiştir.

Tablo 4. 1 Nanopartikül optimizasyonunda kullanılan parametreler

NP No	Bileşenler		PVA		Çözücü		Sonikasyon Süresi ve Sonikasyon Gücü
	Sinapik Asit (mg)	PLGA (mg)	İç faz %-ml	Dış faz %-ml	Etil Alkol (ml)	DCM(ml)	
1	10	100	4 ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	1 ml	1,5ml	90 sn 80 W
2	30	100	4 ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	1 ml	1,5ml	90 sn 80 W
3	40	100	4 ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	1 ml	1,5ml	90 sn 80 W
4	50	100	4 ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	1 ml	1,5ml	90 sn 80 W
5	60	100	4 ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	1 ml	1,5ml	90 sn 80 W
6	70	100	4 ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	1 ml	1,5ml	90 sn 80 W
7	90	100	4 ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	1 ml	1,5ml	90 sn 80 W
8	60	100	4 ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	1 ml	1 ml	90 sn 80 W

Tablo 4. 2 Nanopartikül optimizasyonunda kullanılan parametreler(devamı)

NP No	Bileşenler		PVA		Çözücü		Sonikasyon Süresi ve Sonikasyon Gücü
	Sinapik Asit (mg)	PLGA (mg)	İç faz %-ml	Dış faz %-ml	Etil Alkol (ml)	DCM(ml)	
9	60	100	5 ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	1 ml	1 ml	90 sn 80 W
10	60	100	5 ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	1 ml	1 ml	90 sn 80 W
11	60	100	5 ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	1 ml	1 ml	90 sn 80 W
12	60	75	5 ml PVA(%1,5)	35ml PVA(%0,1)	0,5 ml	1,5 ml	90 sn 80 W
13	60	100	5 ml PVA(%1,5)	35ml PVA(%0,1)	0,5 ml	1,5 ml	90 sn 80 W
14	60	125	5 ml PVA(%1,5)	35ml PVA(%0,1)	0,5 ml	1,5 ml	90 sn 80 W
15	60	75	5 ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	0,5 ml	1,5 ml	90 sn 80 W
16	60	100	5 ml PVA(%1,5)	35ml PVA(%0,1)	0,5 ml	1,5 ml	90 sn 80 W
17	80	100	5 ml PVA(%1,5)	35ml PVA(%0,1)	0,5 ml	1,5 ml	90 sn 80 W
18	90	100	5 ml PVA(%1,5)	35ml PVA(%0,1)	0,5 ml	1,5 ml	90 sn 80 W
19	100	100	5 ml PVA(%1,5)	35ml PVA(%0,1)	0,5 ml	1,5 ml	90 sn 80 W
20	80	75	5 ml PVA(%1,5)	35ml PVA(%0,1)	0,5 ml	1,5 ml	90 sn 80 W
21	80	100	5 ml PVA(%1,5)	35ml PVA(%0,1)	0,5 ml	1,5 ml	90 sn 80 W
22	80	125	5 ml PVA(%1,5)	35ml PVA(%0,1)	0,5 ml	1,5 ml	90 sn 80 W

Tablo 4.1 incelendiğinde ; ilk önce artan sinapik asit miktarları baz alınarak 7 farklı nanopartikül sentezlenmiştir. NP1-NP7 partiküllerine ait enkapsülasyon etkinliği, ilaç yükleme kapasitesi ve reaksiyon verimleri incelendiğinde en iyi değerleri sağlayan madde miktarı 60 mg olarak belirlenmiştir. 70 mg ve 90 mg etken madde içeren partiküllerin enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasiteleri 60 mg'dan fazla olmasına rağmen 90 mg etken madde içeren partikül hem boyut olarak hem de zeta potansiyeli bakımından uygunluk göstermemektedir. 70 mg etken madde içeren partikülün ise boyut olarak küçük olmasına rağmen zeta potansiyeli oldukça

yüksektir. Zeta potansiye yüksekliği yüzeyde adsorbe olan serbest molekül olma ihtimalini düşündürmüş, partiküllere ait FT-IR spektrumları çekildiğinde yüzeye adsorbe moleküller oldukça net bir şekilde gözlenmiştir.

8 numaralı sentez için; 60 mg etken madde içeren partiküllerin enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasiteleri istenen değerlerde olmasına rağmen boyutlar yüksek olduğu için w/o oranı artırılmıştır. Başlangıçta 4 ml PVA (w –yağ fazı-) ve 2,5 ml organik solvent (o –su fazı-) içeren oranda DCM miktarı 1,5 ml'den 1 ml'ye indirilerek artan w/o ile boyutun küçülmesi amaçlanmıştır.

NP 8, NP5 ile kıyaslandığında enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi neredeyse sabit kalırken boyut 571 nm'den 411 nm'ye kadar inerek istenilen etki gözlemlenmiştir.

Emülsiyondaki w/o oranının artırılması ile boyutun küçülmesi sonucunda yeniden 60 mg etken madde içeren partiküller sentezlenmiş ve 411 nm olan boyutun daha da düşürülmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, deney 9-10-11 kurulmuş ve w/o oranı tekrar artırılmıştır. Bu aşamada polimer ile etken maddenin çözünürlüğü baz alınarak organik solvent yerine PVA miktarının artırılmasına karar verilmiş ve PVA miktarı 4 ml'den 5 ml'ye çıkartılmıştır. Yapılan sentezlere ait değerler hesaplandığında boyut ve PDI değerlerinin istenilen düzeyde olduğu gözlenmiştir.

Tekrarlı sentezler ile yapılan analizler sonucunda istenilen boyutlara ulaşılmış ancak çekilen FT-IR spektrumlarında yüzeye çok az miktarda da olsa serbest maddenin adsorbe olduğu ve bunun sinapik asit-polimer karışımının %100 çözünememesinden kaynaklandığı düşünölmüştür. Bu nedenle w/o oranı sabit tutulmuş ancak yağ fazında bulunan etil alkol ve DCM miktarları değiştirilmiştir. Total hacim 2 ml olacak şekilde etil alkol miktarı 1 ml'den 0,5 ml'ye indirilirken DCM miktarı 1 ml'den 1,5 ml'ye çıkarılmış ve çözünürlüğün artması sağlanmıştır. Emülsiyon içeriğindeki w/o oranı sabit tutulduğundan boyuta etkisinin değişmeyeceği düşünölerek NP12-NP16 sentezlerinde PLGA miktarının verime ve genel karakterizasyona olan etkisine bakılmak istenmiş bu nedenle 100 mg standart dışında 75 mg ve 125 mg PLGA kullanılarak 5 sentez yapılmıştır. 75 mg PLGA kullanılan sentezlerde ise PVA etkisini karşılatırabilmek için PVA oranı %1,5 ve %3 olacak şekilde ayarlanmıştır. NP12-NP16 serisinde boyutlar ve PDI

değerleri beklenildiği gibi düşük çıkmış, %3'lük PVA içeren partikülün ilaç yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon etkinliği %1,5'lük PVA içeren partiküllere kıyasla daha düşük çıkmıştır. Reaksiyon verimi ve genel olarak karakterizasyon değerlerine bakıldığında ise PLGA miktarının ciddi bir etki göstermediği, ortalama olarak eski sentezlere yakın olduğu gözlenmiş ve sonraki sentez aşamaları için 100 mg ideal polimer miktarı olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu sentez serisinde nanopartiküllere ait FT-IR spektrumları alınmış ve yüzeye adsorbsiyon olmadığı gözlenmiştir.

PLGA miktarı ve PVA konsantrasyonu değiştirildikten ve sinapik asit ile polimerin çözünürlük problemi ortadan kaldırıldıktan sonra belirlenen yeni organik solvent miktarları ile daha fazla madde çözülebileceği ve ilaç yükleme kapasitesinin artırılabilirliği düşünülerek etken madde miktarı artırılmak istenmiş ve tüm değerler sabit tutulup 80-90 ve 100 mg sinapik asit kullanılarak 3 yeni sentez yapılmıştır. NP17-NP19 serisinde artan sinapik asit değerleri ile birlikte beklenildiği üzere enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi artmış, boyutlar önceki sentezlerde standardize edildiği gibi beklenen düşük değerlerde çıkmıştır. Ancak burada da yine partiküllerin FT-IR spektrumları çekilmiş ve 90 mg ile 100 mg etken madde içeren partiküllerde yüzey adsorbsiyonu gözlenmiştir. Dolayısı ile kullanılacak etken madde miktarının maksimum değeri 80 mg olarak kabul edilmiş ve optimize sentezlerde bu miktarın kullanılmasına karar verilmiştir.

Optimize nanopartikülleri sentezlemeden önce son kez PLGA miktarındaki değişimin partikül karakterizasyonuna etkisine bakılmak istenmiş ve tüm parametreler sabit tutulup yalnızca PLGA miktarları değiştirilerek NP20-NP22 serisi sentezlenmiştir. Sırasıyla 75 mg, 100 mg ve 125 mg PLGA kullanılan bu sentezlerde 75 mg PLGA içeren partikülün enkapsülasyon etkinliği ve reaksiyon verimi diğer partiküllerden düşük çıkarken 125 mg PLGA içeren partiküllerde ise ilaç yükleme kapasitesi belirgin bir şekilde azalmıştır.

Bu nedenle optimize formülasyon için 80 mg sinapik asit ile birlikte 100 mg PLGA kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4. 3 Sentezlenen partiküllere ait sonuçlar

NP No	Reaksiyon Verimi		Enkapsülasyon Etkinliği % (EE)	İlaç Yükleme Kapasitesi % (DL)	Boyut Z-Ave (nm)	Çoklu Dağılım İnteksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
	Miktar mg	Verim %					
1	74,4	67,64	56,64	7,61	336,7	0,353	-21,5
2	67,8	52,15	63,11	27,92	410,8	0,343	-20,3
3	68,58	48,99	63,11	37,10	868,3	0,570	-24,9
4	82	54,67	66,45	40,52	1050	0,677	-16,1
5	75,03	46,89	69,20	55,34	571,9	0,424	-21,6
6	92,1	54,18	74,47	56,60	334,6	0,262	-12,6
7	111	58,42	80,41	65,20	749	0,444	-18,4
8	71,5	44,69	69,36	58,2	411,8	0,351	-19,8
9	64	40	74,06	69,43	185,5	0,113	-23,7
10	60,3	37,69	73,91	73,54	178,1	0,096	-20,7
11	61,7	38,56	72,60	70,60	180,3	0,12	-21,9
12	50,8	37,63	42,52	50,22	149	0,169	-12,9
13	73,6	46	36,75	29,96	154,1	0,147	-15
14	100,5	54,32	46,37	27,68	157,8	0,138	-13,8
15	46	34,07	25,38	31,80	146,4	0,144	-12,5
16	65	40,63	36,18	33,4	148,8	0,134	-18,1
17	85,7	47,61	53	49,47	164,1	0,090	-22,4
18	106	55,79	66,88	56,79	161,3	0,117	-20,4
19	85,8	42,9	69,87	81,43	153,2	0,112	-20,5

Tablo 4. 4 Sentezlenen partiküllere ait sonuçlar (devamı)

NP No	Reaksiyon Verimi		Enkapsülasyon Etkinliği % (EE)	İlaç Yükleme Kapasitesi % (DL)	Boyut Z-Ave (nm)	Çoklu Dağılım İnteksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
	Miktar mg	Verim %					
20	66,9	43,16	47,59	56,91	142,6	0,106	-16
21	92,3	51,28	56,36	52,02	146,2	0,089	-19
22	112,7	54,98	55,88	39,66	152,2	0,078	-18,3

Tablo 4.1 değerlendirildiğinde nanopartikül sentezinde etken madde ve polimer miktarı, organik solvent, surfaktan konsantrasyonu ve miktarının oldukça önemli parametreler olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.2'ye göre sonuçları değerlendirecek olursak; NP1-NP7 serisinde artan etken madde miktarı ile birlikte enkapsülasyon etkinliği genel olarak, ilaç yükleme kapasitesi ise belirgin bir şekilde artmıştır. Reaksiyon verimi, boyut dağılımı ve çoklu dağılım indeksleri ve zeta potansiyel değerlerine bakıldığında dengesizlikler mevcut olup bu değerlerin etkilenmesinde yüzeye adsorbe olan moleküllerin ve w/o oranının etkisi olduğu belirlenmiştir. İlk sentez serisinde reaksiyon verimleri minimum %46,89 iken maksimum %67,64 olarak belirlenmiştir. Enkapsülasyon etkinliği değerleri %56,64 ile %80,41 arasında, ilaç yükleme kapasiteleri ise %7,61 ile %65,20 arasında artan madde miktarına paralel olarak artmıştır. En küçük boyutun 334,6 nm olarak ölçüldüğü sentez serisinde boyutlar oldukça büyük olup 1050 nm'ye kadar çıkmıştır. Boyutlara paralel olarak çoklu dağılım indekleri de değişkenlik göstermiş, partiküller homojen bir boyut dağılımı sergileyememiştir. Özellikle yüzeye adsorbe olan moleküllerin yüzey yükünü etkilemesi sonucunda düzensiz bir zeta potansiyel grafiği gözlenmiş, -12,6 mV ile 24,9 mV arasında oldukça geniş bir skalada ölçümler alınmıştır. Sentezlenen ilk nanopartikül serisi sonuçları incelendiğinde en düzgün sonuçların 60 mg etken madde içeren NP5 örneğine ait olduğu belirlenmiş ve 60 mg etken madde kullanılarak karakterizasyon çalışmalarına başlanmıştır. Öncelikle hücre kültüründe

kullanılması mümkün olmayacağından büyük boyutların düşürülmesi hedeflenmiş, DCM miktarı azaltılarak w/o oranı artırılmış ve NP8 sentezlenmiştir.

NP8 örneğine ait sonuçlar incelendiğinde reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitelerinin NP5 ile hemen hemen aynı olduğu ancak artan w/o oranı ile birlikte 571,9 nm olan partikül boyutunun 411,8 nm'ye düştüğü ve boyut ile ilişkili olarak çoklu dağılım indeksinin 0,424'ten 0,351'e indiği gözlenmiştir.

NP5 ve NP8 karşılaştırıldığında emülsiyon içeriğindeki yağ-su fazının değiştirilmesi partikül boyutunda oldukça efektif bir etki göstermiş, bu nedenle w/o miktarı daha da artırılarak NP9-NP11 serisi sentezlenmiştir. Artan PVA miktarının etkisi ile partikül boyutları 178,8 nm, 180,3 nm, ve 185,5 nm olarak ölçülmüş, hücre kültürü deneylerinde kullanılacak uygun boyutlara ulaşılmıştır. Değiştirilen tek parametrenin PVA miktarı olduğu NP9-NP11 serisinde reaksiyon verimi ve enkapsülasyon etkinliği NP8 ile benzer oranlarda çıkarken ilaç yükleme kapasitesinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Çoklu dağılım indekslerinin 0,096-0,113 arasında ölçülmesi partiküllerin oldukça homojen bir dağılım gösterdiğini belirtirken zeta potansiyel ölçümleri ise beklenen yüzey yük dağılımını vermiştir. Ancak partiküllere ait FT-IR spektrumları çekildiğinde yüzeye adsorbe az miktarda serbest sinapik asit molekülü olduğu gözlenmiş, etken madde ve polimerin tam olarak çözülemediği düşünülerek w/o oranı değiştirilmeden etil akol ve DCM miktarları değiştirilerek NP12-NP16 serisi sentezlenmiştir.

Çözünürlüğün artırılması ile sentezlenen NP12-NP16 serisinde 75 mg PLGA ile kullanılarak sentezlenen NP12 ve NP15 birbiri ile kıyaslandığında reaksiyon verimi, boyut ve zeta potansiyel yaklaşık olarak aynı değerlerde çıkarken yüksek konsantrasyonlu PVA enkapsülasyon etkinliğini ve ilaç yükleme kapasitesini düşürmüştür. 100 mg PLGA ile iki tekrarlı olarak sentezlenen NP13 ve NP16 birbiri ile kıyaslandığında sonuçların tekrarlanabilir olduğu, ancak 75 mg PLGA içeren partiküllerle karşılaştırıldığında reaksiyon verimi yüksek olsa da enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi bakımından değerlerin düştüğü gözlenmiştir. 125 mg PLGA içeren NP14 örneğinde ise reaksiyon verimi ve enkapsülasyon etkinliği artmış olsa da belirgin bir artış mevcut değildir. Ayrıca ilaç yükleme

kapasitesi NP13 ve NP16 ile neredeyse aynıdır. Dolayısı ile genel olarak bakıldığında PLGA miktarının ciddi bir etki göstermediği gözlenmiş ve sonraki sentez aşamaları için 100 mg ideal polimer miktarı olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.1'e ait yorumlarda da belirtildiği üzere yeni organik solvent miktarları ile daha fazla madde çözülebileceği ve ilaç yükleme kapasitesinin artırılabilceği düşünülerek etken madde miktarı artırılarak 80, 90 ve 100 mg sinapik asit kullanılarak NP17-NP19 serisi sentezlenmiştir. Bu sentezlerde boyutlar 164,1 nm, 161,3 nm ve 153,2 nm şeklinde olup beklenildiği gibi düşük çıkmıştır. 0,090-0,117 arasında değişen çoklu dağılım indeksleri ve ortalama -21,1 mV zeta potansiyel değerleri ile partiküllerin homojen bir dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca artan madde miktarına paralel olarak enkapsülasyon etkinliği sırasıyla %53, %66,88 ve %69,87 şeklinde; ilaç yükleme kapasitesi ise %49,47, %56,79 ve %81,43 şeklinde artış göstermiştir. Ancak NP17-NP19 serisine ait partiküllerin FT-IR spektrumları çekildiğinde 90 mg ile 100 mg etken madde içeren partiküllerde yüzey adsorpsiyonu gözlenmiştir. Bu nedenle kullanılacak etken madde miktarının maksimum değeri 80 mg olarak kabul edilmiş ve madde miktarı ile diğer parametreler sabit tutularak artan PLGA miktarlarına bağlı değişimin partikül karakterizasyonuna etkisine bakılmış NP20-NP22 serisi sentezlenmiştir.

NP20-NP22 serisinde sırasıyla 75 mg, 100 mg ve 125 mg PLGA kullanılmış, artan polimer miktarına bağlı olarak reaksiyon verimi sırasıyla %43,16, %51,28 ve %54,98 şeklinde artmıştır. Enkapsülasyon etkinliklerine bakıldığında NP20'nin NP21 ve NP22'ye kıyasla daha düşük olduğu, bu nedenle 75 mg polimer kullanımının faydalı bir model oluşturmayacağı düşünülmüştür. İlaç yükleme kapasitelerine bakıldığında ise artan polimer miktarı oranına ters bir şekilde azalma olduğu gözlenmiştir. NP20 %56,91 ve NP21 %52,02 şeklinde olup belirgin bir azalma gözlenmezken NP22 %39,66 ilaç yükleme kapasitesine sahiptir ve oldukça düşüktür. Dolayısı ile 125 mg polimer kullanımının faydalı bir model oluşturmayacağı düşünülmüştür. Boyut, çoklu dağılım indeksleri ve zeta potansiyel değerleri üç partikül için de benzer sonuçlar göstermiş, bu nedenle optimize partiküllerde tüm koşullar için ideal değerleri sağlayan 100 mg polimer kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3 Optimize Nanopartiküller

Enkapsülasyon etkinliği, ilaç yükleme kapasitesi ve boyut bakımından optimize edilen partiküllerin sentezi NP21 parametrelerinde 80 mg etken madde ve 100 mg polimer kullanılarak NP23-NP27 numaralı deneyler ile 5 tekrarlı olarak yapılmış olup; salım, sitotoksisite ve genotoksisite deneylerine bu optimize partiküllerin homojen karışımı ile devam edilmiştir. Homojenizasyon için; Optimize nanopartiküller birleştirilerek havanda nazıkçe dövülmüştür. Tablo 4.3'te optimize partiküllere ait sonuçlar ve ortalama değerleri verilmiştir.

Tablo 4. 5 Hücre deneylerinde kullanılan optimize nanopartiküller

NP No	Reaksiyon Verimi		Enkapsülasyon Etkinliği % (EE)	İlaç Yükleme Kapasitesi % (DL)	Boyut Z-Ave (nm)	Çoklu Dağılım İnteksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
	Miktar mg	Verim %					
23	95,6	53,11	54,74	45,81	149,9	0,070	-24
24	91,9	51,06	51,36	44,71	152,3	0,081	-22,5
25	92,2	51,22	60,79	52,74	158,9	0,087	-21,1
26	105,7	58,72	53,81	40,73	158	0,090	-22,9
27	88,1	48,94	52,19	47,39	159,3	0,074	-22
Ort	94,7	52,61	54,58	46,28	155,7	0,080	-22,5

NP 23- NP27 serisinde reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği, ilaç yükleme kapasitesi, boyut ve zeta potansiyellerine bakıldığında tüm partiküller için dar bir skalada benzer sonuçlar alınmıştır. Reaksiyon verimleri %48,94 ile %58,72 arasında değişen partiküllerin enkapsülasyon etkinliği %51,36-%60,79 aralığında, ilaç yükleme kapasitesi %40,73-%52,74 aralığında, boyutları 149,9 nm – 159,3 nm arasında, çoklu dağılım indeksleri 0,070 ile 0,090 arasında, zeta potansiyel değerleri ise -24 ile -21,1 arasındadır.

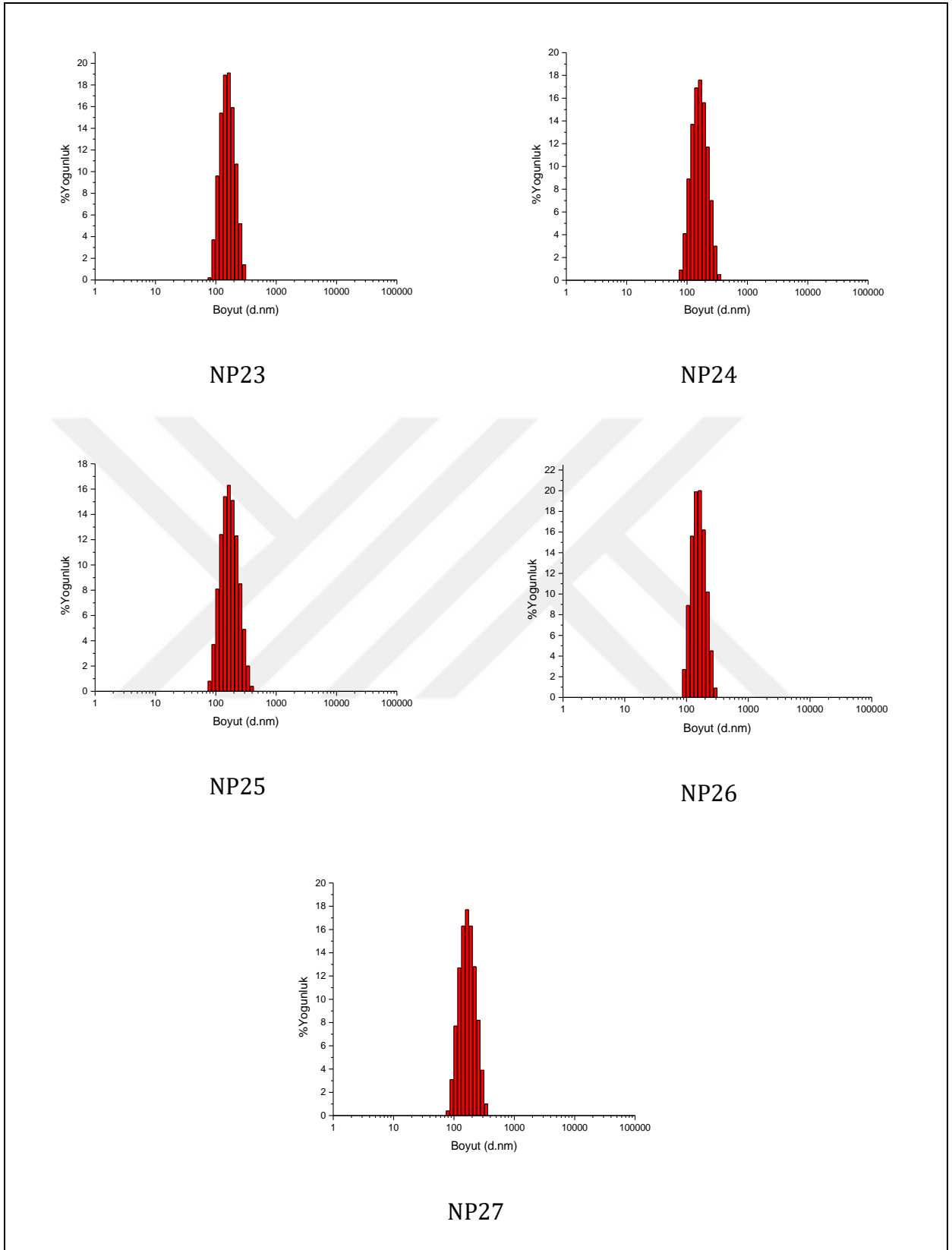
Elde edilen katı nanopartikül miktarının sentezde kullanılan toplam katı madde miktarına oranlanması sonucu optimize nanopartiküller için ortalama reaksiyon verimi %52,61 olarak hesaplanmıştır.

Sentezlenen optimize partiküllerin enkapsülasyon etkinliği indirekt tayin yöntemi ile üst fazdan UV ölçümü yapılarak hesaplanmış ve %54,58 olarak bulunmuştur.

Optimize nanopartiküller için ilaç yükleme verimi hesaplandığında ortalama değer %46,28 olarak bulunmuş, *In vitro* salım deneylerinde, sitotoksosite ve genototoksosite deneylerinde bu değer üzerinden hesaplamalar yapılarak ilaç dozu belirlenmiştir.

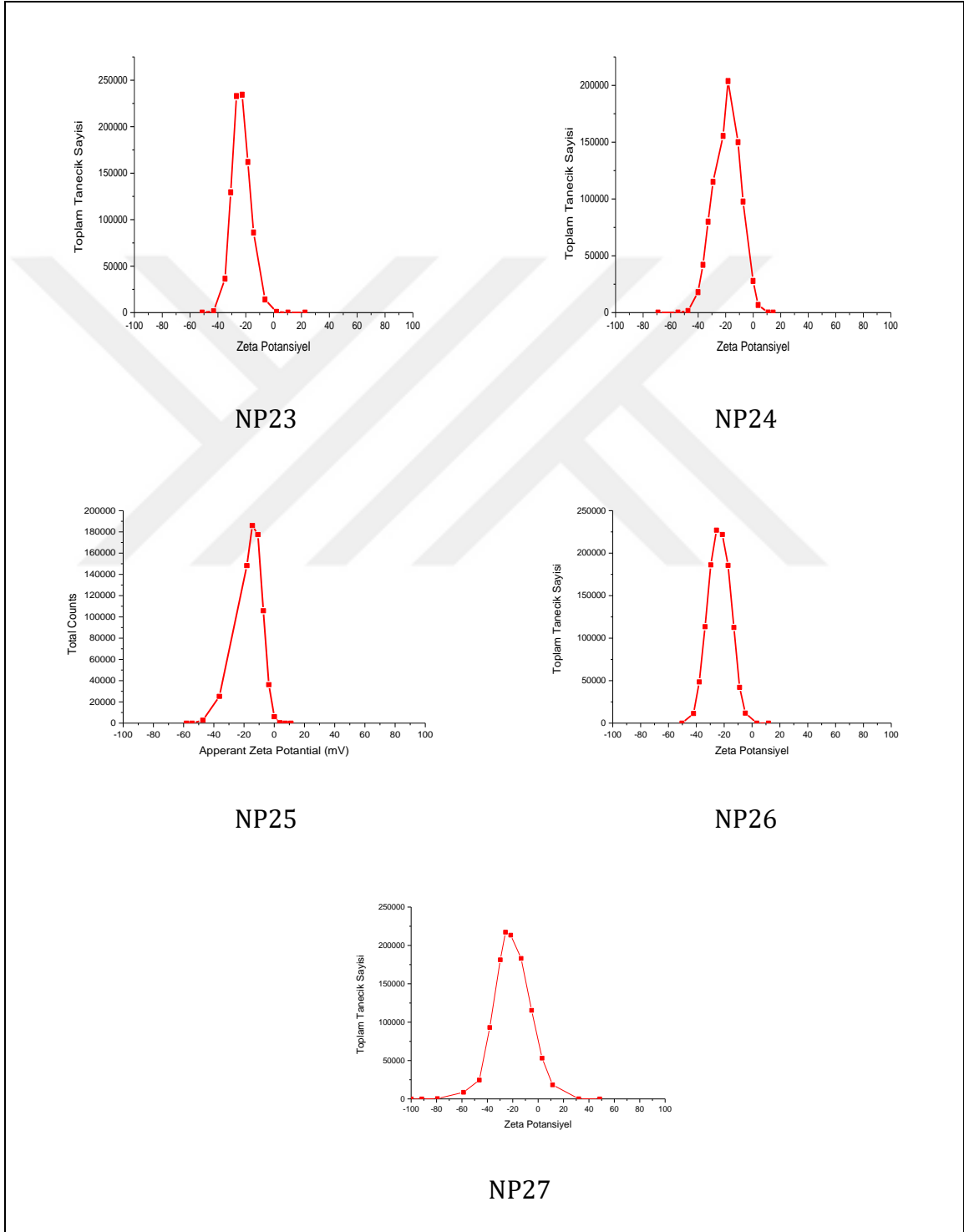
Tekli emülsiyon (w/o) çözücü uçurma yöntemi ile sentezlenen nanopartiküllerin boyut analizi zeta sizer cihazı ile yapılmış, optimize partiküllere ait boyut değerleri ortalama 155,7 nm olarak belirlenmiştir. Boyut dağılımını belirleyen çoklu dağılım indeksleri 0,080 olarak ölçülmüştür. Optimize partiküllere ait boyut dağılım analiz grafikleri Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4. 6 Optimize nanopartiküllere ait boyut dağılım analiz grafikleri



Nanopartiküllere ait yüzey özelliklerini belirlemeye yarayan zeta potansiyel değerleri zeta sizer cihazı ile belirlenmiştir. Optimize partiküllere ait zeta potansiyel değerleri ortalama $-22,5$ mV olarak belirlenmiştir. Optimize partiküllere ait zeta potansiyel dağılım analiz grafikleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

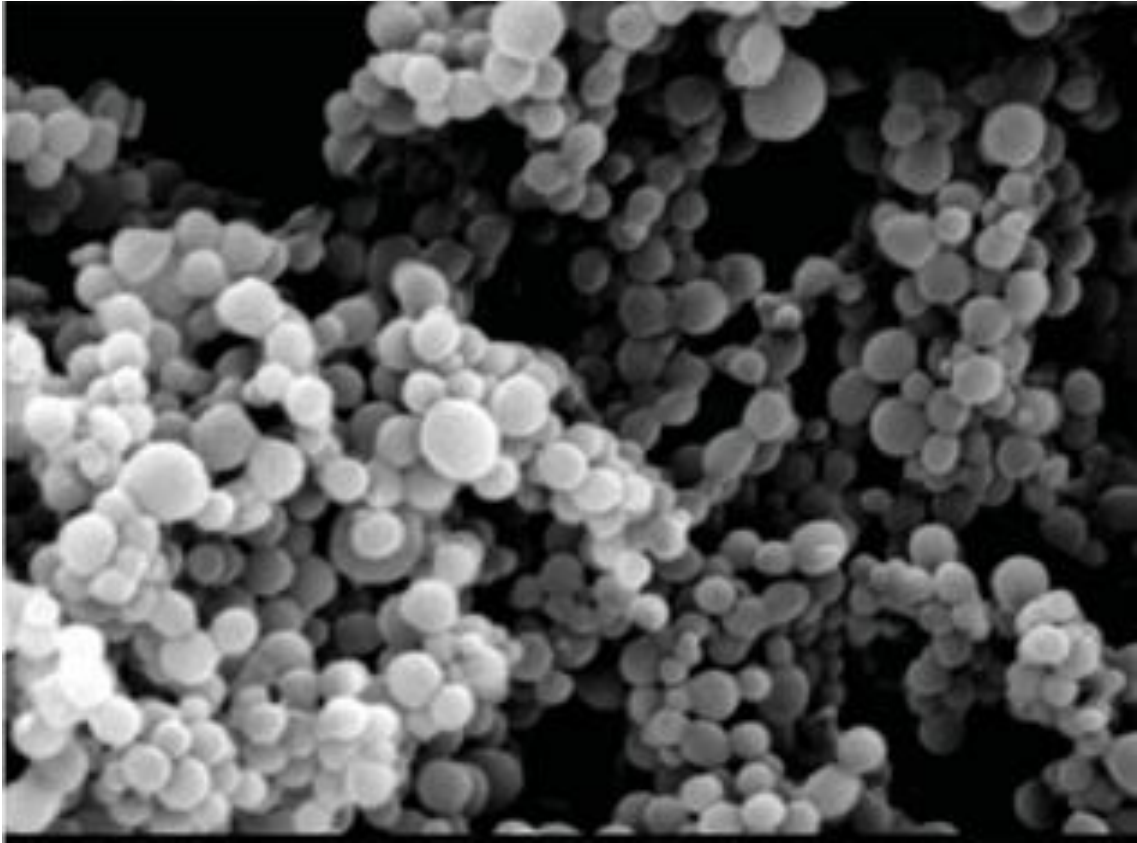
Tablo 4. 7 Optimize nanopartiküllere ait zeta potansiyel dağılım analiz grafikleri



4.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Optimize edilmiş nanopartiküllere ait boyut analizi, şekil ve yüzey morfolojisi incelenirken Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Görüntü analizi öncesi iletkenliği bulunmayan nanopartiküllere altın ile kaplama işlemi yapılarak iletkenliği sağlanmıştır. Kaplamada altın kullanılmasının amacı altın elementinin yüksek iletkenliğinin olması ve oksitlenmemesidir. Nanopartiküllere ait görüntüler 60.000X büyütme oranı ile Carl-Zeiss EVO LS10 taramalı elektron mikroskobunda alınmıştır (Şekil 4.5).

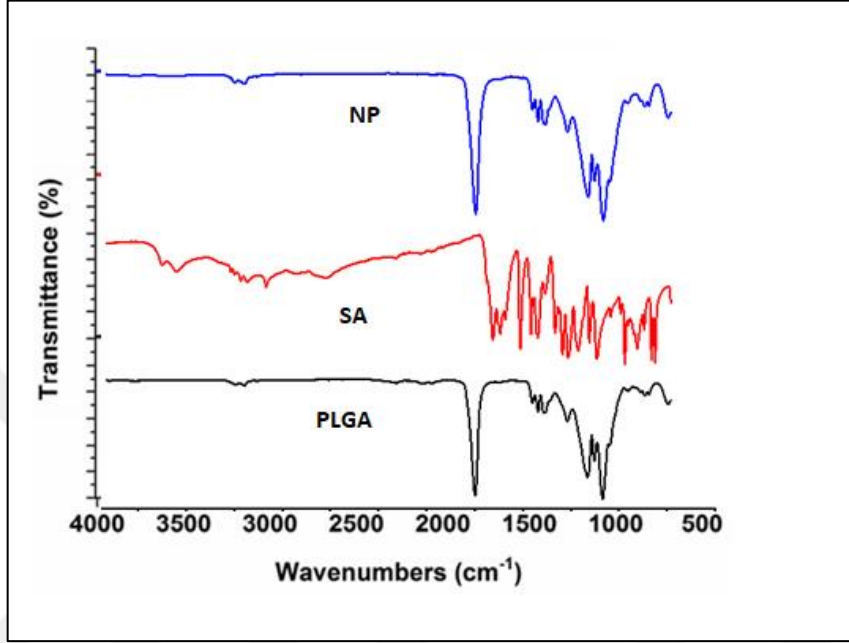
Sinapik asit yüklü optimize partiküllere ait SEM görüntüleri incelendiğinde boyutların ortalama 90 nm ile 170 nm arasında olduğu, yüzeyde herhangi bir etken madde görülmediği, partiküllerin küresel şekilde ve homojen olarak dağıldığı gözlenmiştir.



Şekil 4. 5 Optimize nanopartiküllere ait 60.000X büyütme oranı ile çekilmiş SEM görüntüsü.

4.5 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi

Etken madde-polimer etkileşimlerinin belirlenebilmesi ve üretilen optimize nanopartiküllerin içinde/yüzeyinde yer alan etken maddenin tespit edilebilmesi amacıyla serbest sinapik asit molekülü, PLGA ve sinapik asit yüklü optimize nanopartiküllerin FT-IR spektrumları çekilmiştir (Şekil 4.6).

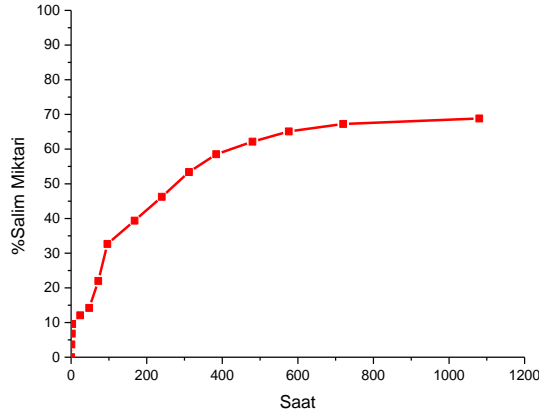


Şekil 4. 6 Serbest sinapik asit, PLGA polimeri ve sinapik asit yüklü nanopartiküllere ait FT-IR spektrum grafiği

Elde edilen FT-IR spektrum analiz sonuçlarına göre optimize nanopartiküllerin PLGA karakteristiğinde olduğu ve dolayısı ile sinapik asitin nanopartiküler sistem içerisine etkin bir şekilde hapsedildiği gözlenmiştir.

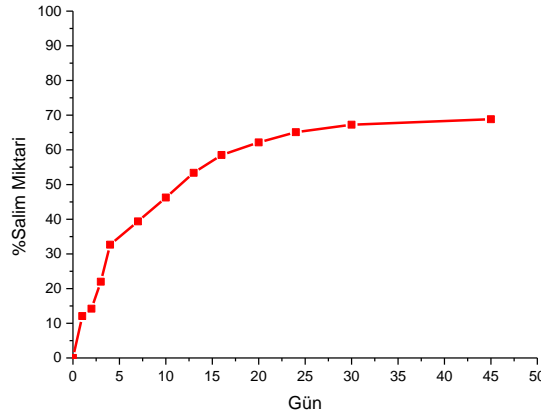
4.6 Optimize Nanopartiküllere Ait *In Vitro* Salım Değerlerinin İncelenmesi

PBS tamponu içerisinde (pH : 7,4) süspanse edilerek 37 °C' de, 200 rpm'de yatay olarak çalkalamaya bırakılan optimize nanopartiküllerin salım deneyleri 45 gün sürmüştür. Örnekler belirli sürelerde 10000 rpm'de, 20 dk, +4 °C'de santrifüj edilerek üst fazları toplanmış ve UV-spektrofotometrede 306 nm'de ölçüm alınmıştır. Şekil 4.7'de saatlere göre ve Şekil 4.8'de günlere göre verilen nanopartiküllerin salım grafiği incelendiğinde salımın kontrollü bir şekilde artarak gerçekleştiği, 45 gün sonunda madde miktarının %68'inin salındığı görülmüştür.



Şekil 4. 7 Saatlere göre *In vitro* salım değerlerine ait sonuçlar

Nanopartiküler sistem saat bazında birinci gün ilk 3 saat ve bunları takip eden ilk dört gün boyunca 24, 48, 72 ve 96. saatler şeklinde düzenli olarak takip edilmiştir. İlk 3 saat içerisinde partikülün yaklaşık %10'unu saldı, 24. saatte bu değer %12'ye ve 48. saatte %14'e çıktığı gözlenmiştir. Hücre kültürü deneylerinde kullanılacak miktarlar 24. ve 48. saatlerdeki salım değerlerine karşılık gelen serbest sinapik asit miktarı bulunarak hesaplanmış, partiküler sistemde ilaç yükleme kapasitesi de baz alınarak serbest maddeye denk miktarda nanopartikül 24. saat için 12,75 mg, 48. saat için 14,71 mg olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 8 Günlere göre *In vitro* salım değerlerine ait sonuçlar

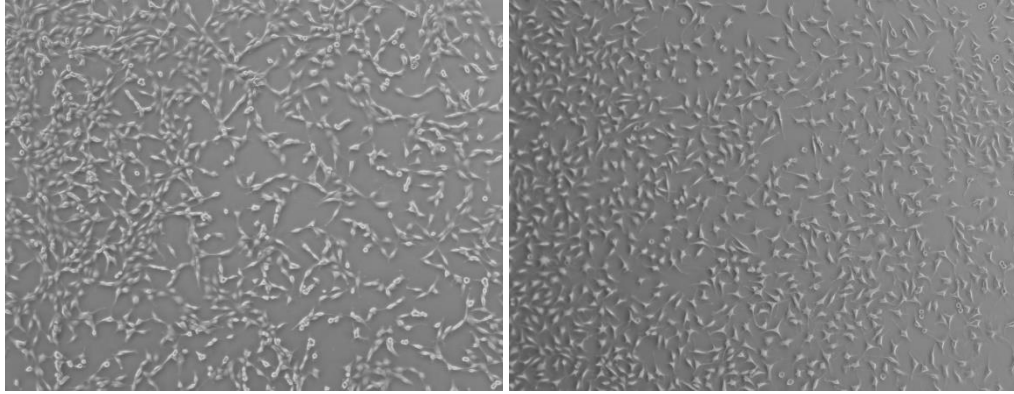
Günlere göre salımın takibi 96. saatin ardından üçer gün arayla 7., 10., 13. ve 16. gün şeklinde değerlere bakılması ve daha sonra ölçüm periyodunun artırılarak toplamda 45. güne kadar takip edilmesi şeklinde olmuştur. 3. günde %21 olan

salım, 4. günde %32'ye çıkmış takip eden günlerde düzenli bir artış göstererek 20. günde ortalama %62 seviyesine çıkmıştır. 20. günden sonraki süreçlerde ise partiküle ait salım yavaşlamış ve ilaç daha az miktarlarda salınmaya başlanmıştır. 20. gün ile 45. gün arasında geçen süreçte partikül salınımı %62'den %68'lere kadar çıkabilmiştir. Bu da ilaç sistemi olarak kullanılacak partikülün ortalama 20 gün düzenli olarak etki ettiğini, daha sonra dozajın yenilenmesi gerektiğini göstermektedir.

4.7 *In vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

C6 glioma hücre hattı (şekil 4.9-A) Benda ve ark. tarafından N-nitrozometilüre ile indüklenmiş sıçanlarda oluşan tümörlerden klonlanmış ve altkültüründen elde edilen bir dizi pasajın ardından glioblastoma çalışmalarında kullanılmak üzere model oluşturulmuştur [126].

Ana L suşu, 1948 yılında 100 günlük erkek C3H fare areolar ve yağ dokusundan türetilen L929 fare fibroblast hücre hattı (Şekil 4.9-B), ana suşun 95. alt kültür üretiminden oluşturulmuştur. Yumuşak doku kültürü olan bu hücreler, fibroblast olarak günümüzde *In vitro* çalışmalarda en çok kullanılan hücre hattı modelidir[104].



A

B

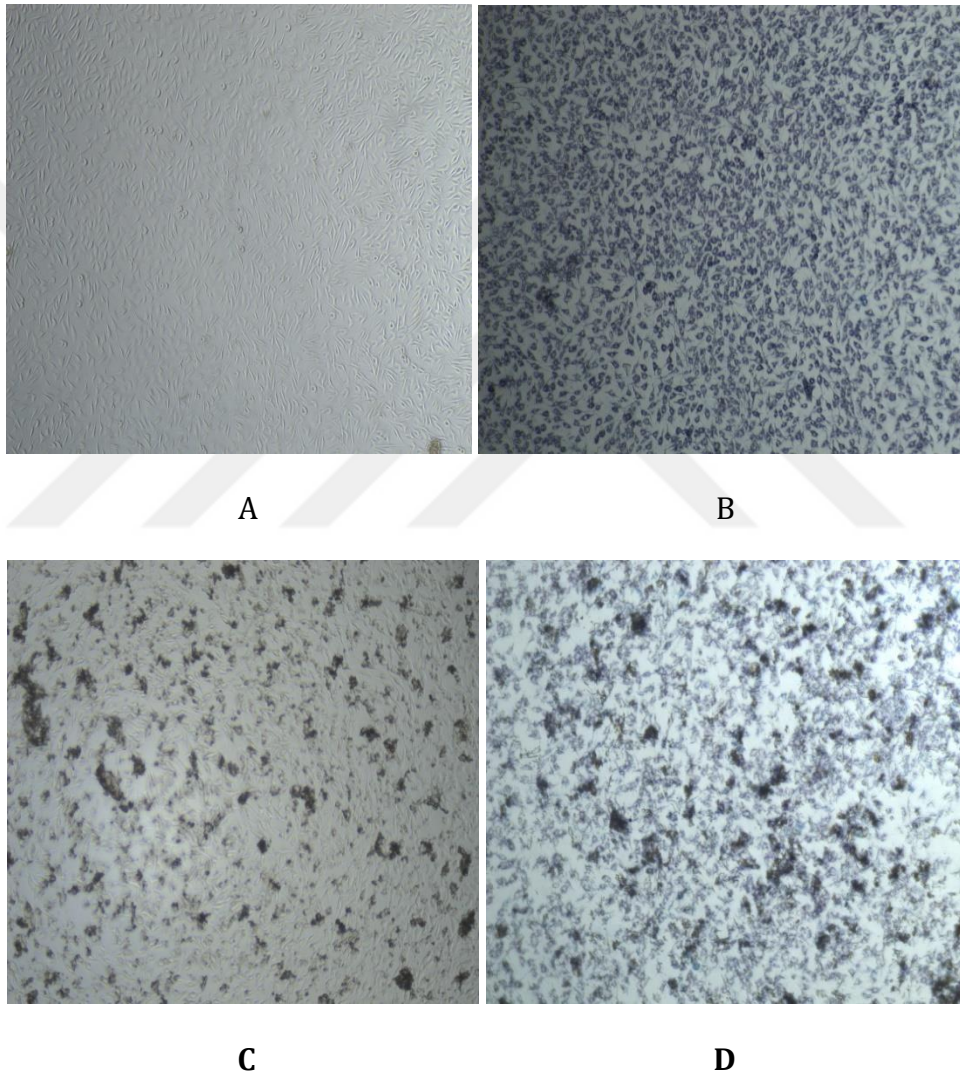
Şekil 4. 9 C6 Glioma ve L929 Fibroblast hücrelerinin faz kontrast mikroskopunda 5X objektif altında morfolojik görüntüleri.

A: C6 Glioma hücre hattı (kültüre ait ikinci gün), B: L929 Fibroblast hücre hattı(kültüre ait birinci gün)

4.8 Sitotoksosite Çalışmaları

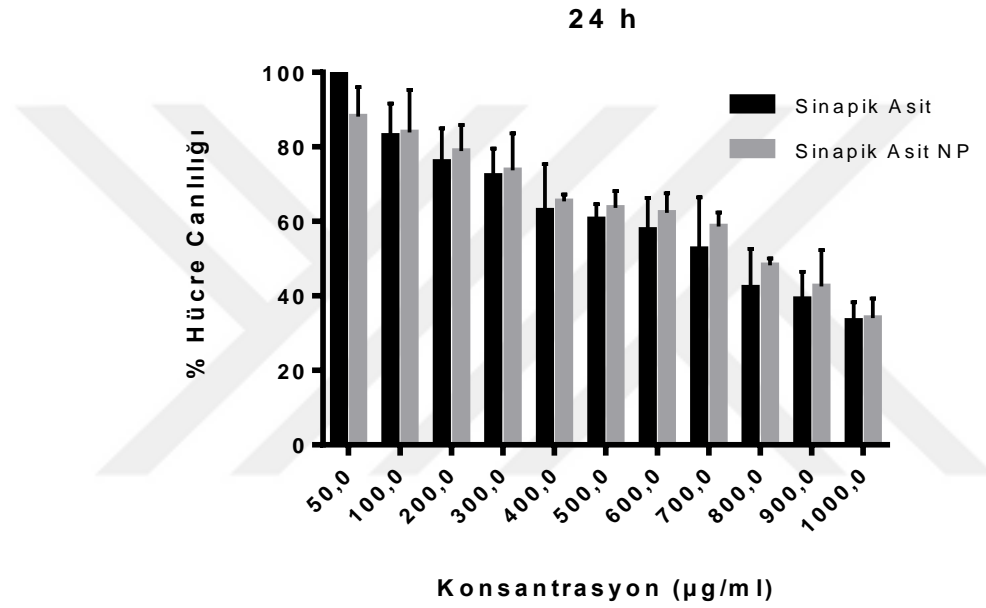
4.8.1 L929 Fibroblast Hücre Hattında Sitotoksosite Analizi

Sinapik asit yüklü optimize nanopartiküllerin L929 Fibroblast (Şekil 4.10) hücre soyları üzerindeki sitotoksosite analizleri MTT testi ile yapılmıştır. Canlı hücre mitokondrisinde bulunan oksidatif enzimlerin tetrazolyum halkasını parçalaması sonucu sarı renkli MTT boyasının mor fomazan kristallerine dönüştüğü bu yöntemde ölü ve canlı hücreler spektrofotometrik olarak belirlendi.



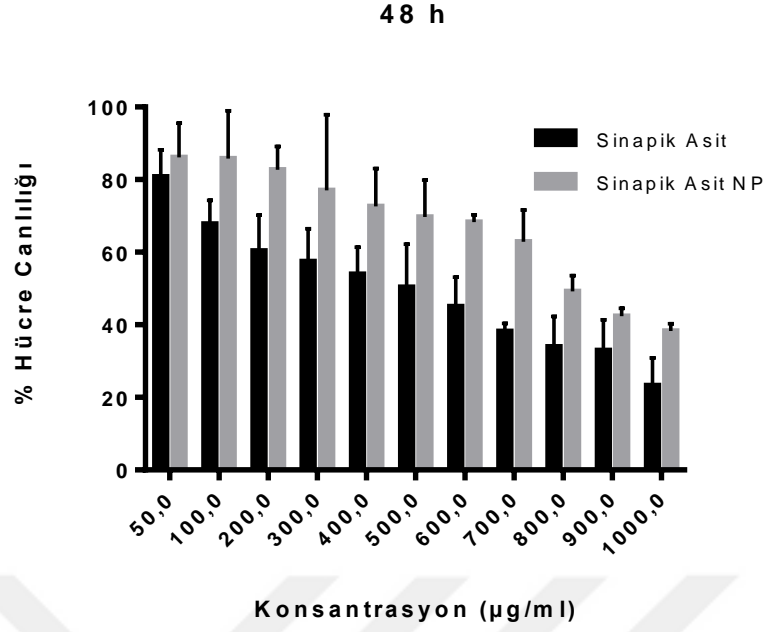
Şekil 4. 10 L929 fibroblast hücrelerinde MTT sonucu oluşan formazan yapıları (24.saat-500µg/ml). A: Serbest sinapik asit uygulanan hücre B: Serbest sinapik asit uygulanan hücrenin MTT görüntüsü C: Sinapik asit yüklü nanopartikül uygulanan hücre D: Sinapik asit yüklü nanopartikül uygulanan hücrenin MTT görüntüsü.

MTT deneyi için salım grafiklerine göre nanopartiküler sistemin 24. ve 48. saat değerlerine denk gelen salım miktarları baz alınarak serbest sinapik asit molekülü ve optimize sinapik asit yüklü nanopartiküller 50-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında hücrelere uygulandı. Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de bulunan grafiklerde serbest sinapik asit molekülü ve sinapik asit yüklü optimize nanopartiküle ait farklı konsantrasyonlara denk gelen hücre canlılık oranları gösterildi. Elde edilen grafikler doğrultusunda hücre hatlarına etki eden serbest sinapik asit ve sinapik asit NP’ye ait IC50 değeri belirlendi.



Şekil 4. 11 L929 Fibroblast hücre hattına ait %canlılık (24 saat)

Şekil 4.11’e göre serbest sinapik asit ve sinapik asit NP’nin genel olarak artan dozlarda hücrelerde canlılık yüzdesini azalttığı belirlendi. 24 saatlik inkübasyon sonrası uygulanan MTT sonucunda serbest sinapik aside ait IC50 değeri 811,0 µg/ml bulunurken, sinapik asit yüklü nanopartikül için IC50 değeri 960,0 µg/ml olarak belirlendi. L929 hücre hattı için 24. saatte toksik etki ancak çok yüksek dozlarda görülmekte olup nanopartiküler sistem serbest maddeye kıyasla daha yüksek dozlarda etkili olmuştur.



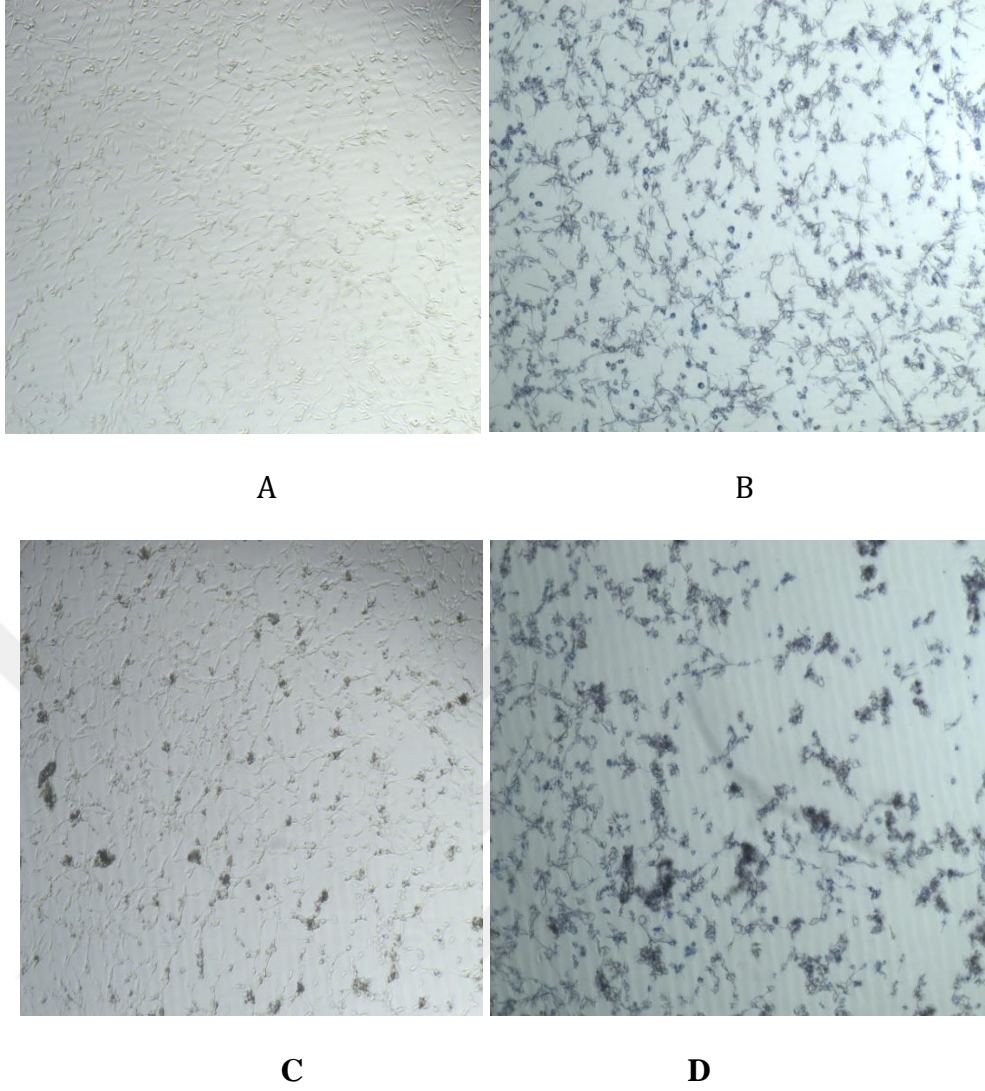
Şekil 4. 12 L929 Fibroblast hücre hattına ait %canlılık (48 saat)

Şekil 4.122ye göre 48. saatte MTT sonucunda serbest sinapik aside ait IC50 değeri 567,4 µg/ml bulunurken sinapik asit yüklü nanopartikül için değer 815,7 µg/ml olarak belirlendi. L929 hücre hattında 48. saat için serbest sinapik aside ait toksik sınır 24. saate kıyasla biraz daha düşmüş olmasına rağmen serbest sinapik asit L929 hücre hattı üzerinde düşük dozlarda toksik değildir. Nanopartiküler sistemin ise ancak oldukça yüksek dozlarda toksik etki göstermesi serbest sinapik aside kıyasla daha avantajlı olduğunu göstermektedir.

L929 Fibroblast hücre hattı için serbest sinapik asit ve nanopatiküler sistem ancak yüksek dozlarda sitotoksik etki gösterirken, ikili olarak kıyaslandıklarında 24. ve 48. saatlerin her biri için partiküler sistemin serbest maddeye oranla daha az sitotoksik olduğu belirlendi.

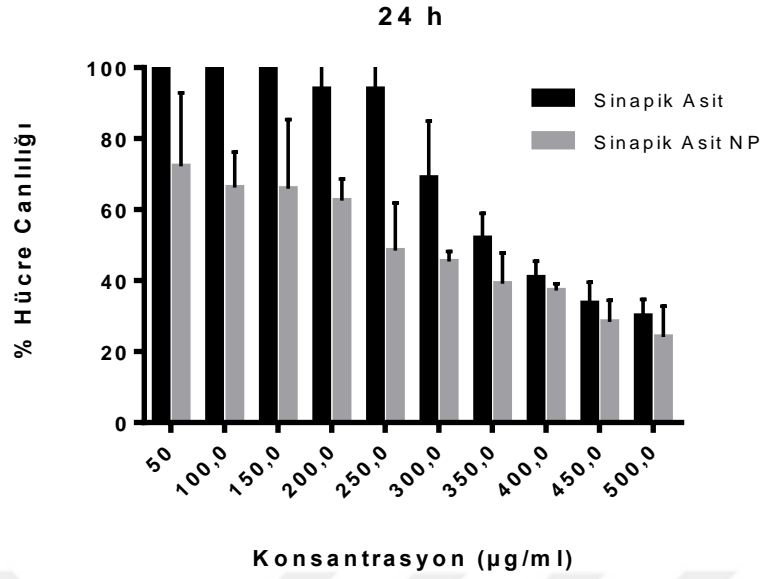
4.8.2 C6 Glioma Hücre Hattında Sitotoksisite Analizi

Sinapik asit yüklü optimize nanopartiküllerin L929 Fibroblast hücre soyları üzerindeki sitotoksisite analizleri yapıldıktan sonra C6 glioma hücre soyu üzerinde MTT testi ile (Şekil 4.13) sitotoksisitesine bakıldı.



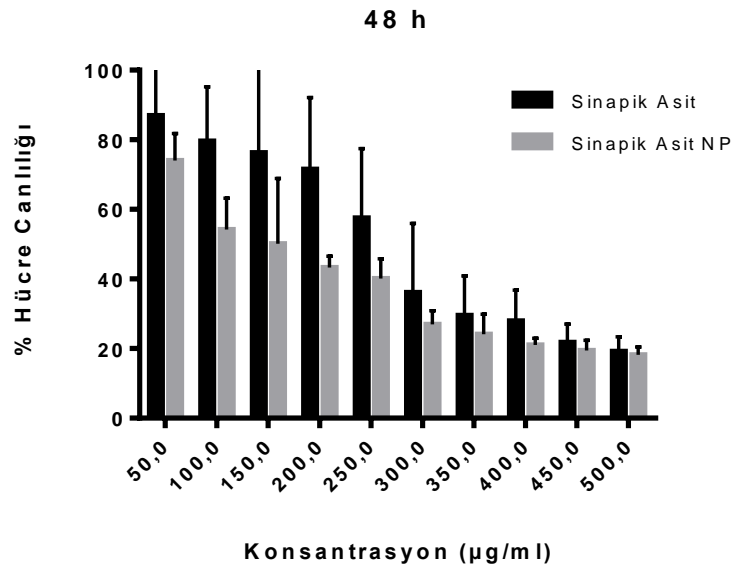
Şekil 4. 13 C6 Glioma hücrelerinde MTT sonucu oluşan formazan yapıları (24. saat-300 µg/ml). A: Serbest sinapik asit uygulanan hücre B: Serbest sinapik asit uygulanan hücrenin MTT görüntüsü C: Sinapik asit yüklü nanopartikül uygulanan hücre D: Sinapik asit yüklü nanopartikül uygulanan hücrenin MTT görüntüsü.

MTT deneyi için salım grafiklerine göre nanopartiküler sistemin 24. ve 48. saat değerlerine denk gelen salım miktarları baz alınarak serbest sinapik asit molekülü ve optimize sinapik asit yüklü nanopartiküller 50-500 µg/µl konsantrasyon aralığında C6 Glioma hücrelerine uygulandı. Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de bulunan grafiklerle serbest sinapik asit molekülü ve sinapik asit yüklü optimize nanopartiküle ait farklı konsantrasyonlara denk gelen hücre canlılık oranları gösterildi. Elde edilen grafikler doğrultusunda hücre hatlarına etki eden serbest sinapik asit ve sinapik asit nanopartikül IC50 değerleri belirlendi.



Şekil 4. 14 C6 Glioma hücre hattına ait %canlılık (24 saat)

Şekil 4.14'e göre antikanser aktivitesi bilinen serbest sinapik asitin C6 Glioma hücrelerinde artan dozlarda etkili olduğu belirlendi. Partiküler sistem ise etken maddeye kıyasla çok daha etkili bir şekilde hücre canlılığını azalttı. 24. saatte uygulanan MTT sonucunda serbest sinapik aside ait IC50 değeri 348,2 µg/ml bulunurken sinapik asit yüklü nanopartikül için değer 256,3 µg/ml'dir.



Şekil 4. 15 C6 Glioma hücre hattına ait %canlılık (48 saat)

48. saatte serbest sinapik asit molekülü IC50 değeri 314,7 µg/ml iken optimize nanopartikül 130,3 µg/µl değerinde etki gösterdi(Şekil 4.15). Sinapik asit nanopartikülün serbest maddeye oranla daha düşük dozda daha yüksek etki gösterdiği 48. saat deneylerinde de belirgin bir şekilde belirlendi.

Sonuç olarak anti kanser özelliği bilinen sinapik asit molekülü ile kıyaslandığında suda çözünebilir ve biyobozunur bir ilaç olarak tasarlanan sinapik asit yüklü optimize nanopartiküllerin C6 Glioma hücrelerini serbest sinapik asitten daha etkin bir şekilde inhibe ettiği belirlendi.

Sitotoksosite deneyleri sonucunda elde edilen etkin dozlar doğrultusunda C6 Glioma hücre hattı üzerinde genotoksosite testleri yapıldı.

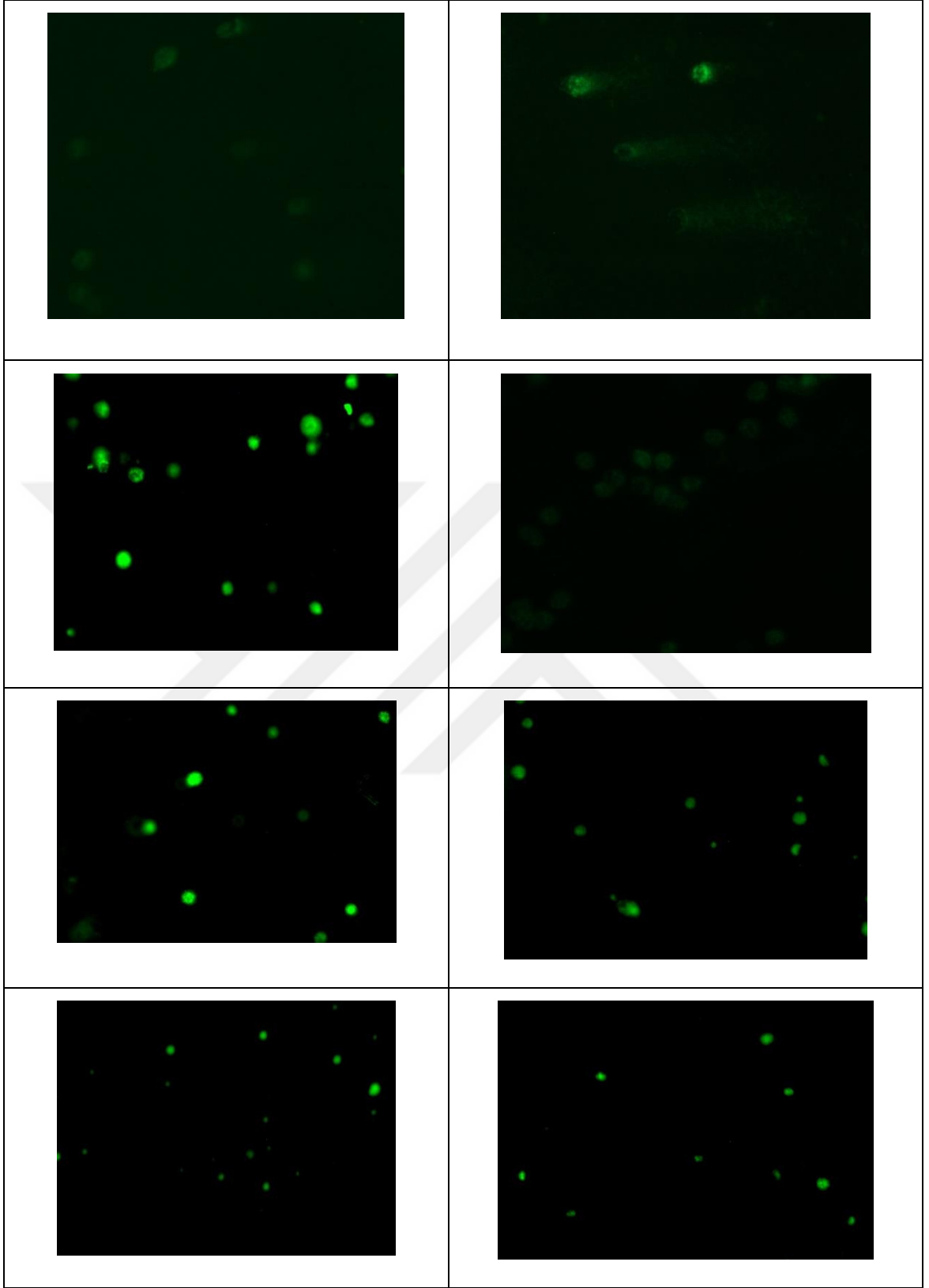
4.9 Genotoksosite Çalışmaları

Sinapik asit yüklü optimize nanopartiküllerin C6 Glioma hücre soyları üzerindeki genotoksosite analizleri Comet Assay testi ile yapıldı. Ökaryotik hücrelerde DNA hasarı belirlenmesini sağlayan Comet Assay testi serbest sinapik asit ve sinapik asit NP ile C6 Glioma hücre hattı üzerinde 24. ve 48. saat inkübasyonlarda gerçekleştirildi.

Deneyde pozitif kontrol olarak H₂O₂ kullanıldı. Hücreler yaklaşık 5 dk %0,5'lik H₂O₂'ye maruz bırakıldı, ardından normal besiyeri ile büyütülmeye devam edildi.

Belirli dozlarda uygulanan serbest sinapik asit ve sinapik asit NP ile birlikte pozitif ve negatif kontrollere ait preparatlar SYBR Green ile boyanarak floresan mikroskopta incelendi ve görüntüleme esnasında her lamdan rastgele seçilen en az 50 hücre sayılarak kuyruk yoğunluğu (tail intensity ; TI), kuyruk uzunluğu (tail length ; TL) ve kuyruk momenti (tail moment ; TM) belirlenmiş, DNA hasarının varlığı ve oranı Image-J programı yardımı ile incelendi.

Şekil 4.16'da serbest sinapik asit molekülü ve sinapik asit yüklü optimize nanopartiküle ait Comet Assay görüntüleri, Tablo 4.6'da ise analiz sonuçları verilmiştir.



Şekil 4. 16 Genotoksik ajana maruz bırakılmış hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü. A1-A2 : Pozitif kontrol grubu(24-48 saat), B1-B2 : Negatif kontrol grubu(24-48 saat), C1-C2 : Serbest sinapik asit molekülü verilen hücre grubu(24-48 saat), D1-D2 : Sinapik Asit Yüklü NP verilen hücre grubu(24-48 saat)

C6 Glioma hücre hattında 24. saatte negatif kontrol grubuna ait kuyruk yoğunluğu (TI), $13,48 \pm 3,876$; kuyruk uzunluğu (TL), $49,0 \pm 13,661$; kuyruk momenti (TM), $20,07 \pm 5,153$ olarak; pozitif kontrol grubuna ait kuyruk yoğunluğu (TI), $19,464 \pm 10,027$; kuyruk uzunluğu (TL), $81,0 \pm 4,160$ ve kuyruk momenti (TM), $23,219 \pm 12,195$ olarak belirlendi. Serbest sinapik asit molekülünde etkin doz olan $3482 \mu\text{g/ml}$ 'nin oluşturduğu kuyruk yoğunluğu (TI), $9,52 \pm 3,37$; kuyruk uzunluğu (TL), $42,7 \pm 11,567$; kuyruk momenti (TM), $8,46 \pm 2,27$ olarak bulunurken, optimize nanopartikül için ise etkin doz olan $2563 \mu\text{g/ml}$ 'nin oluşturduğu kuyruk yoğunluğu (TI), $5,95 \pm 2,430$; kuyruk uzunluğu (TL), $18,467 \pm 5,841$; kuyruk momenti (TM), $7,623 \pm 2,5$ olarak belirlendi.

48. saatte negatif kontrol grubuna ait kuyruk yoğunluğu (TI), $13,163 \pm 4,028$; kuyruk uzunluğu (TL), $61,0 \pm 9,41$; kuyruk momenti (TM), $18,602 \pm 4,95$ olarak; pozitif kontrol grubuna ait kuyruk yoğunluğu (TI), $28,117 \pm 7,184$; kuyruk uzunluğu (TL), $88,0 \pm 23,648$ ve kuyruk momenti (TM), $24,130 \pm 6,92$ olarak belirlendi. Serbest sinapik asit molekülünde etkin doz olan $3147 \mu\text{g/ml}$ 'nin oluşturduğu kuyruk yoğunluğu (TI), $9,40 \pm 3,52$; kuyruk uzunluğu (TL), $55,0 \pm 13,37$; kuyruk momenti (TM), $8,54 \pm 1,718$ olarak bulunurken, optimize nanopartikül için ise etkin doz olan $1303 \mu\text{g/ml}$ 'nin oluşturduğu kuyruk yoğunluğu (TI), $5,21 \pm 2,530$; kuyruk uzunluğu (TL), $20,520 \pm 4,25$; kuyruk momenti (TM), $7,167 \pm 3,763$ olarak belirlendi.

Tablo 4. 8 Comet Assay analiz sonuçları

	24. saat			48. saat		
	TI	TL	TM	TI	TL	TM
Pozitif Kontrol	$19,464 \pm 10,027$	$81,0 \pm 4,160$	$23,219 \pm 12,195$	$28,117 \pm 7,184$	$88,0 \pm 23,648$	$24,130 \pm 6,92$
Negatif Kontrol	$13,48 \pm 3,876$	$49,0 \pm 13,661$	$20,07 \pm 5,153$	$13,163 \pm 4,028$	$61,0 \pm 9,41$	$18,602 \pm 4,95$
Serbest Sinapik Asit	$9,52 \pm 3,37$	$42,7 \pm 11,567$	$8,46 \pm 2,27$	$9,40 \pm 3,52$	$55,0 \pm 13,37$	$8,54 \pm 1,718$
Sinapik Asit Yüklü NP	$5,95 \pm 2,430$	$18,467 \pm 5,841$	$7,623 \pm 2,5$	$5,21 \pm 2,530$	$20,520 \pm 4,25$	$7,167 \pm 3,763$

Comet Assay sonuçları incelendiğinde en uzun kuyruk yapısı H₂O₂ ile DNA hasarı oluşturulan pozitif kontrol grubunda görüldü. DNA hasar oranları, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentine bakıldığında pozitif kontrol grubunu sırası ile negatif kontrol, serbest sinapik asit ve sinapik asit yüklü nanopartikül grubu takip etmektedir. Hücrelerin genel olarak 0. ve 1. Dereceden kuyruk yapısı oluşturduğu, nanopartiküler sistemin DNA hasarını azaltmada serbest sinapik aside kıyasla daha etken rol oynadığı belirlendi.

4.10 Tartışma ve Öneriler

Yapılan araştırmalarda çeşitli fenolik bileşiklerin kullanıldığı nanopartiküler sistemlerin oldukça yaygın olduğu; bu çalışmaların sonucunda moleküllere ait farmakolojik özelliklerin partiküler sistemler yardımı ile genellikle daha etkili olduğu gözlenmiştir.

MCF-7 hücreleri üzerinde kafeik asit yüklü katı lipid nanoparçacıkların etkileri MTT testi ve Annexin V-PI analizi ile belirlemiş, sonuç olarak kafeik asit yüklü nanoparçacıkların serbest kafeik aside kıyasla MCF-7 hücreleri üzerinde daha etkili olduğunu belirlemiştir [64].

Hipoglisemi ve yara iyileşmesi üzerinde ferulik asit yüklü polimerik nanopartiküllerin etkilerinin incelendiği bir çalışmada nanopartiküller oral ve topikal olarak sıçanlara uygulanmış, sonuçlar ferulik asit yüklü nanopartiküllerin diyabetik sıçanlarda yara iyileşmesini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir [65].

P. aeruginosa, E. coli, S. aureus ve metisiline dirençli S. aureus üzerinde agar kuyu difüzyon metodu, disk difüzyon metodu ve broth mikrodilüsyon yöntemleri ile kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in serbest ve PLGA içine enkapsüle edilmiş formları karşılaştırıldığında serbest CAPE'nin uygulanan yöntemlerin hiçbirinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı, CAPE yüklü nanopartiküllerin ise önemli antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu belirlenmiştir [66].

Hesperetin ve hesperetin yüklü PLGA nanopartiküllerinin anti-kanser özelliklerinin değerlendirdiği bir çalışmada polimerik nanopartiküllerin, glioblastoma hücreleri üzerinde anti-kanser aktivite ve terapötik ajanların zayıf çözünürlüğünü arttırmada büyük avantajlara sahip olduğunu gösterilmiştir [67].

Literatürde partiküler sistemlere yüklenmiş olarak çalışılmamış olan sinapik asit molekülünün geniş spektrumda farmakolojik özellikler gösterdiği belirlenmiş ve toksisitesi üzerine yapılan çalışmalarda genel olarak molekülün herhangi bir toksik etki yaratmadığı gözlenmiştir.

T47D insan göğüs kanseri hücreleri üzerinde seçici fenolik bileşiklerin anti-proliferatif ve apoptotik etkileri incelendiğinde sinapik asit içeren fenoliklerin T47D hücrelerine doz bağımlı ve zaman bağımlı antiproliferatif bir etki gösterdiği bildirilmiştir [60].

Sinapik asitin Cu^{+2} varlığında pBR322 plasmid DNA'sındaki etkinliği araştırılmış, insan fariyelositik lösemi (HL-60) hücre proliferasyonuna karşı diğer fenolik bileşiklere göre DNA hasarında dikkate değer derecede daha etkili olduğu bulunmuştur [62].

Gentamisin'in neden olduğu nefrotoksisiteyi değerlendirmek için sinapik asitin renoprotektif fonksiyonları ve bu fonksiyona aracılık eden yollar incelendiğinde böbreklerde oksidatif / nitrozatif stres, iltihaplanma ve apoptozun aşağı regülasyonu yoluyla böbrek yetmezliğini ve yapısal yaralanmaları azalttığı gözlemlenmiştir [63].

Hameed ve ark. hamster akciğer fibroblast hücresi V79 ve insan serviks kanser hücresi HeLa üzerinde sinapik asitin sitotoksik özelliklerini incelediğinde IC50 değerlerini sırasıyla V79 ve HeLa hücreleri için 1860 μ M ve 7248 μ M olarak bulmuştur[127].

Eroğlu ve ark. tarafından yapılan çalışmada sinapik asit molekülünün PC-3 ve LNCaP insan prostat kanser hücreleri üzerindeki antikanser mekanizmaları incelenmiş, yapılan XTT analizinde 72. saat IC50 değeri her iki hücre hattı için de 1000 μ M olarak bulunmuştur[59].

Sinapik asit molekülünün antigenotoksik etkisi ile ilgili literatürde çok fazla çalışma olmamakla birlikte Lee-Manion ve ark. HT-29 insan kolon kanseri hücreleri üzerinde uyguladıkları Comet Assay yönteminde sinapik asit molekülünün 3.7 ± 3.1 μ mol/L EC50 değeri ile antigenotoksik etki gösterdiğini kanıtlamıştır[128].

Bu tez çalışmasında geniş spektrumlu farmakolojik özelliklere sahip, suda çözünürlüğü düşük bir molekül olan Sinapik Asit molekülünün nanopartiküler sistemlere yüklenmesi ile çözünürlüğünün ve biyouyumluluğunun artırılması ve daha düşük dozlarda daha etkili nanopartiküler formülasyonların geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Nanopartiküler sistemlerin hazırlanması tekli emülsiyon (o/w) çözücü uçurma yöntemi ile gerçekleştirilmiş olup karakterizasyon reaksiyon verimi (RY), enkapsülasyon etkinliği (EE), etken yüklenme verimi (DL), boyut (Z-Ave), çoklu dağılım indeksi (PDI) ve zeta potansiyel (mV) analizleri incelenmiş, ayrıca FT-IR ve SEM analizleri yapılmıştır.

Optimize nanopartikülü elde edebilmek için farklı miktarlarda PLGA, sinapik asit, PVA, organik solvent kullanılmış, böylece minimum boyutta, maksimum enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesine sahip partiküllerin üretilmesi hedeflenmiştir.

NP1-NP7 serisinde artan etken madde miktarı ile birlikte enkapsülasyon etkinliği genel olarak, ilaç yükleme kapasitesi ise belirgin bir şekilde artmıştır. Reaksiyon verimleri minimum %46,89 iken maksimum %67,64 olarak belirlenmiş, enkapsülasyon etkinliği değerleri %56,64 ile %80,41 arasında, ilaç yükleme kapasiteleri ise %7,61 ile %65,20 arasında artan madde miktarına paralel olarak artmıştır. En küçük boyutun 334,6 nm olarak ölçüldüğü sentez serisinde boyutlar oldukça büyük olup 1050 nm'ye kadar çıkmıştır. Boyutlara paralel olarak çoklu dağılım indekleri de değişkenlik göstermiş, partiküller homojen bir boyut dağılımı sergileyememiştir. Özellikle yüzeye adsorbe olan moleküllerin yüzey yükünü etkilemesi sonucunda düzensiz bir zeta potansiyel grafiği gözlenmiş, -12,6 mV ile 24,9 mV arasında oldukça geniş bir skalada ölçümler alınmıştır.

NP8 için reaksiyon verimi %44,69, enkapsülasyon etkinliği %69,36, ilaç yükleme kapasitesi %58,2 olarak hesaplanmış, boyut 411,8 nm olarak ölçülürken PDI değeri 0,358, zeta potansiyeli ise -19,8 mV olarak ölçülmüştür.

NP9-NP11 serisinde reaksiyon verimleri %37,69 ile %40 arasında, enkapsülasyon etkinliği %72,60-%74,06 arasında, ilaç yükleme kapasitesi %69,43-%73,54

arasında değişirken boyutlar 178 nm ile 185 nm arasında dağılım göstermiştir. Çoklu dağılım indeksi ve zeta potansiyel açısından sonuçlar benzer olup PDI değeri 0,096-0,113 arasında iken zeta potansiyelleri -20,7 mV ile - 23,7 mV arasında çıkmıştır.

NP12-NP16 serisinde %34,07- %54,32 aralığında RY, %25,38-%46,37 aralığında EE, %27,68-%50,22 aralığında DL değerleri bulunmuş olup minimum boyutta NP15 146,4 maks,mum boyutta NP14 157,8 olarak ölçülmüştür. 0,134-0,169 arasında değişen çoklu dağılım indeksleri ile partiküler sistemler homojen bir yapı göstermiş, zeta potansiyeli -12,5 mV /-18,1 mV aralığındadır.

Yeni organik solvent miktarları ile daha fazla madde çözülebileceği ve ilaç yükleme kapasitesinin artırılabilceği düşünülerek etken madde miktarı artırılarak 80, 90 ve 100 mg sinapik asit kullanılarak NP17-NP19 serisi sentezlenmiştir. Bu sentezlerde boyutlar 164,1 nm, 161,3 nm ve 153,2 nm şeklinde olup beklenildiği gibi düşük çıkmıştır. 0,090-0,117 arasında değişen çoklu dağılım indeksleri ve ortalama -21,1 mV zeta potansiyel değerleri ile partiküllerin homojen bir dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca artan madde miktarına paralel olarak enkapsülasyon etkinliği sırasıyla %53, %66,88 ve %69,87 şeklinde; ilaç yükleme kapasitesi ise %49,47, %56,79 ve %81,43 şeklinde artış göstermiştir.

NP20-NP22 serisinde artan polimer miktarına bağlı olarak reaksiyon verimi sırasıyla %43,16, %51,28 ve %54,98 şeklinde artmıştır. Enkapsülasyon etkinliklerine bakıldığında NP20'nin NP21 ve NP22'ye kıyasla daha düşük olduğu, bu nedenle 75 mg polimer kullanımının faydalı bir model oluşturmayacağı düşünülmüştür. İlaç yükleme kapasitelerine bakıldığında ise artan polimer miktarı oranına ters bir şekilde azalma olduğu gözlenmiştir. NP20 %56,91 ve NP21 %52,02 şeklinde olup belirgin bir azalma gözlenmezken, NP22 %39,66 ilaç yükleme kapasitesine sahiptir ve oldukça düşüktür. Dolayısı ile 125 mg polimer kullanımının faydalı bir model oluşturmayacağı düşünülmüştür. Boyut, çoklu dağılım indeksleri ve zeta potansiyel değerleri sırasıyla 142,6-152,2; 0,078-0,106 ; -16 mV / - 19mV'dir.

Optimize nanopartiküller 5 tekrarlı olarak NP23-NP27 serisinde sentezlenmiş, reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği, ilaç yükleme kapasitesi, boyut ve zeta

potansiyellerine bakıldığında dar bir skalada benzer sonuçlar alınmıştır. Reaksiyon verimleri %48,94 ile %58,72 arasında değişen partiküllerin enkapsülasyon etkinliği %51,36-%60,79 aralığında, ilaç yükleme kapasitesi %40,73-%52,74 aralığında, boyutları 149,9 nm – 159,3 nm arasında, çoklu dağılım indeksleri 0,070 ile 0,090 arasında, zeta potansiyel değerleri ise -24 ile -21,1 arasındadır.

Karakterizasyon çalışmalarının ardından üretilen nanopartiküllerin *in vitro* salımına bakılmıştır. Süspansiyon edilmiş nanopartiküller inkübatöre konulduktan sonra salımın yavaş bir şekilde olduğu gözlemlenmiştir. Bu salım, PLGA içinde bulunan molekülün difüzyonundan ve molekülün hidrofobik özelliğinden kaynaklanmaktadır. Belirli aralıklarla santrifüj edilerek üst fazları toplanan ve UV-spektrofotometrede ölçümü alınan örnekler 45 gün takip edilerek salım çalışması yapılmış, nanopartiküllerin salım grafiği incelendiğinde salımın kontrollü bir şekilde artarak gerçekleştiği, 45 gün sonunda madde miktarının %68'inin salındığı görülmüştür.

Sinapik asit yüklü nanopartiküller sistemin optimize formülasyonuna ulaşılması sonrasında biyouyumluluğu yüksek olan partiküller hücre kültürü çalışmalarında sitotoksik ve antigenotoksik etki bakımından incelenmiş, serbest maddeye kıyasla partiküller sistemin çok daha etkili olduğu gözlenmiştir.

Tez kapsamında hazırlanan nanopartiküllerin toksisitesine L929 hücre hattında bakılmış, MTT yöntemi ile yapılan sitotoksikite testinde nanopartiküller sistemin 24. ve 48. saat değerlerine denk gelen salım miktarları baz alınarak serbest sinapik asit molekülü ve optimize sinapik asit yüklü nanopartiküller 50-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında uygulanmıştır. 24. saatte uygulanan MTT sonucunda serbest sinapik aside ait IC50 değeri 811,0 µg/ml bulunurken sinapik asit yüklü nanopartikül için değer 960,0 µg/ml'dir. 48. saatte uygulanan MTT sonucunda serbest sinapik aside ait IC50 değeri 567,4 µg/ml bulunurken sinapik asit yüklü nanopartikül için değer 815,7 µg/ml olarak bulunmuştur.

L929 Fibroblast hücre hattı için serbest sinapik asit ve nanopartiküller sistem ancak yüksek dozlarda sitotoksik etki gösterirken ikili olarak kıyaslandıklarında 24. ve 48. saatlerin her biri için partiküller sistemin serbest maddeye oranla daha az sitotoksik olduğu gözlenmiştir.

Tez kapsamında hazırlanan nanopartiküllerin C6 Glioma hücre hattında sitotoksitesine bakılmış, MTT yöntemi ile yapılan testte nanopartiküler sistemin 24. ve 48. saat değerlerine denk gelen salım miktarları baz alınarak serbest sinapik asit molekülü ve optimize sinapik asit yüklü nanopartiküller 50-500 µg/ml konsantrasyon aralığında uygulanmıştır. 24. saatte uygulanan MTT sonucunda serbest sinapik aside ait IC50 değeri 348,2 µg/ml bulunurken sinapik asit yüklü nanopartikül için değer 256,3 µg/ml'dir. 48. saat deneylerinde ise serbest sinapik asit molekülü IC50 değeri 314,7 µg/ml iken, optimize nanopartikül 130,3 µg/ml değerinde etki göstermiştir. Sonuç olarak anti kanser özelliği bilinen sinapik asit molekülü ile kıyaslandığında suda çözünebilir ve biyobozunur bir ilaç olarak tasarlanan sinapik asit yüklü optimize nanopartiküllerin C6 Glioma hücrelerini serbest sinapik asitten daha etkin bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir.

Sitotoksitate deneyleri sonucunda elde edilen IC50 değerlerinde(belirlenen etkin doz) serbest sinapik asit ve sinapik asit NP uygulaması yapılan C6 Glioma hücre hattı üzerinde genotoksitate testleri yapılmış, deneyde pozitif kontrol olarak H₂O₂ kullanılmıştır. 24. saat için negatif kontrol grubuna ait kuyruk yoğunluğu (TI), 13,48 ± 3,876 ; kuyruk uzunluğu (TL), 49,0±13,661 ; kuyruk momenti (TM), 20,07±5,153 olarak; pozitif kontrol grubuna ait kuyruk yoğunluğu (TI), 19,464 ± 10,027 ; kuyruk uzunluğu (TL), 81,0 ± 4,160 ve kuyruk momenti (TM), 23,219±12,195 bulunmuştur. Serbest sinapik asit molekülünde etkin dozun oluşturduğu kuyruk yoğunluğu (TI), 9,52 ± 3,37 ; kuyruk uzunluğu (TL), 42,7±11,567 ; kuyruk momenti (TM), 8,46±2,27 olarak bulunurken optimize nanopartikül için ise etkin doz değerinde kuyruk yoğunluğu (TI), 5,95±2,430; kuyruk uzunluğu (TL), 18,467±5,841 ; kuyruk momenti (TM), 7,623±2,5 olarak bulunmuştur. 48. saat için ise negatif kontrol grubuna ait kuyruk yoğunluğu (TI), 13,163±4,028 ; kuyruk uzunluğu (TL), 61,0± 9,41 ; kuyruk momenti (TM), 18,602±4,95 olarak; pozitif kontrol grubuna ait kuyruk yoğunluğu (TI), 28,117± 7,184; kuyruk uzunluğu (TL), 88,0±23,648 ve kuyruk momenti (TM), 24,130±6,92 bulunmuştur. Serbest sinapik asit molekülünde etkin dozun oluşturduğu kuyruk yoğunluğu (TI), 9,40±3,52 ; kuyruk uzunluğu (TL), 55,0 ± 13,37; kuyruk momenti (TM),8,54±1,718 olarak bulunurken optimize nanopartikül için ise etkin doz

değerinde kuyruk yoğunluğu (TI), $5,21 \pm 2,530$; kuyruk uzunluğu (TL), $20,520 \pm 4,25$; kuyruk momenti (TM), $7,167 \pm 3,763$ olarak bulunmuştur.

DNA hasar oranları, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentine bakıldığında pozitif kontrol grubu en çok hasara uğrayan grup olup, sırası ile negatif kontrol, serbest sinapik asit ve sinapik asit yüklü nanopartikül grubu takip etmektedir. Genel olarak 0. ve 1. dereceden kuyruk yapısı oluşturan hasarlı hücrelerde nanopartiküler sistem, serbest sinapik aside kıyasla DNA hasarını ve kuyruk oluşumunu önlemede daha etken rol oynamıştır.

Elde edilen bulgular doğrultusunda sentezlenen optimize formülasyonun doku veya hedef organı olumsuz etkileyen kemoterapötik ajanlara alternatif olarak beyin kanseri tedavisinde kullanılacak yeni nesil ilaç ve tedavi ajanlarının geliştirilmesine katkı sağlayacağı, çeşitli fiziksel ve kimyasal etkiler sonucu meydana gelebilecek DNA hasarı sonucunda oluşacak çeşitli hastalıkları önleyebileceği düşünülmektedir. Ayrıca güçlü antikanser ve antigenotoksik etkisi olan hidrofobik moleküllerin ilaç sistemine dönüşmesinde faydalı bir model olabileceği düşünülmektedir.

- [1] H. Hameed, "Evaluation of Cytotoxic And Genotoxic Properties of Sinapic Acid," Master Thesis, Institute of Health Sciences Pharmaceutical Toxicology Programme, Hacettepe University, Republic of Turkey 2014.
- [2] N. Nićiforović and H. Abramovič, "Sinapic acid and its derivatives: natural sources and bioactivity," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 13, pp. 34-51, 2014.
- [3] S. Türksoy, "Fonksiyonel Gıdalar. Fenolik Bileşikler.," *Hacettepe Üniversitesi Ders Notu*, 25.03.2019.
- [4] K. Letchford and H. Burt, "A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes," *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, vol. 65, pp. 259-269, 2007.
- [5] N. Güngördü, Akdeste Mustafaeva, Z. , "Emülsifikasyon Çözücü Buharlaştırma Tekniğiyle BSA Yüklü Nanopartiküllerin Oluşturulması," *Kimya Sanayi Dergisi*, vol. 1, pp. 28-39, 2015.
- [6] P. O. de Souza, S. E. Bianchi, F. Figueiró, L. Heimfarth, K. S. Moresco, R. M. Gonçalves, *et al.*, "Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines," *Toxicology in Vitro*, vol. 51, pp. 23-33, 2018.
- [7] E. Allemann, R. Gurny, and E. Doelker, "Drug-loaded nanoparticles: preparation methods and drug targeting issues," *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, vol. 39, pp. 173-191, 1993.
- [8] H. K. Makadia and S. J. Siegel, "Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier," *Polymers*, vol. 3, pp. 1377-1397, 2011.
- [9] T.C. (30.03.2019). *Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı-Kanser Nedir?* Available: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-nedir-belirtileri>
- [10] G. Ceylan, "Kanserli ve ölümsüzleştirilmiş mezotelyum hücrelerinden seçilen klonlar üzerine kapsaisin etkisinin incelenmesi ", Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2019.
- [11] T.C. (2019, 30.03.2019). *Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı-Kanser Sebepleri*. Available: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-nedir-belirtileri/kanser-nedir-belirtileri1/378-kanserin-nedenleri-ve-sik-gorulen-kanserler.html>
- [12] K. Watanabe, O. Tachibana, K. Sato, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, "Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas," *Brain pathology*, vol. 6, pp. 217-223, 1996.
- [13] H. Ohgaki and P. Kleihues, "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma," *The American journal of pathology*, vol. 170, pp. 1445-1453, 2007.
- [14] F. B. Furnari, T. Fenton, R. M. Bachoo, A. Mukasa, J. M. Stommel, A. Stegh, *et al.*, "Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment," *Genes & development*, vol. 21, pp. 2683-2710, 2007.
- [15] K. Ueki, Y. Ono, J. W. Henson, J. T. Efrid, A. von Deimling, and D. N. Louis, "CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated," *Cancer research*, vol. 56, pp. 150-153, 1996.

- [16] Sigma-Aldrich. (30.03.2019). *Sinapic Acid*. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d7927?lang=en®ion=TR>
- [17] J.-Y. Lee, "Anti-inflammatory effects of sinapic acid on 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in mice," *Archives of pharmacal research*, vol. 41, pp. 243-250, 2018.
- [18] Q. Zhang, J.-X. Hu, X. Kui, C. Liu, H. Zhou, X. Jiang, *et al.*, "Sinapic Acid Derivatives as Potential Anti-Inflammatory Agents: Synthesis and Biological Evaluation," *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, vol. 16, p. 1405, 2017.
- [19] K.-J. Yun, D.-J. Koh, S.-H. Kim, S. J. Park, J. H. Ryu, D.-G. Kim, *et al.*, "Anti-inflammatory effects of sinapic acid through the suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and proinflammatory cytokines expressions via nuclear factor- κ B inactivation," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 56, pp. 10265-10272, 2008.
- [20] M.-E. Cuvelier, H. Richard, and C. Berset, "Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship," *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 56, pp. 324-325, 1992.
- [21] C. Yang, Q. Deng, J. Xu, X. Wang, C. Hu, H. Tang, *et al.*, "Sinapic acid and resveratrol alleviate oxidative stress with modulation of gut microbiota in high-fat diet-fed rats," *Food Research International*, vol. 116, pp. 1202-1211, 2019.
- [22] M. Şahin, "Farklı kök kanal patlarının sitotoksikite ve antimikrobiyal etkinlik yönünden karşılaştırılması," Doktora Tezi, Sağlık bilimleri Enstitüsü,, Ankara Üniversitesi Ankara, 2012.
- [23] S. S. Pekkarinen, H. Stöckmann, K. Schwarz, I. M. Heinonen, and A. I. Hopia, "Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, pp. 3036-3043, 1999.
- [24] C. Chen, "Sinapic acid and its derivatives as medicine in oxidative stress-induced diseases and aging," *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2016, 2016.
- [25] L. Pari and A. M. Jalaludeen, "Protective role of sinapic acid against arsenic-Induced toxicity in rats," *Chemico-biological interactions*, vol. 194, pp. 40-47, 2011.
- [26] T. Niwa, U. Doi, Y. Kato, and T. Osawa, "Inhibitory mechanism of sinapic acid against peroxynitrite-mediated tyrosine nitration of protein in vitro," *FEBS letters*, vol. 459, pp. 43-46, 1999.
- [27] Y. Zou, A. R. Kim, J. E. Kim, J. S. Choi, and H. Y. Chung, "Peroxynitrite scavenging activity of sinapic acid (3, 5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) isolated from Brassica juncea," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, pp. 5884-5890, 2002.
- [28] H. Kikuzaki, M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama, and H. Taniguchi, "Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, pp. 2161-2168, 2002.
- [29] A. Gaspar, M. Martins, P. Silva, E. M. Garrido, J. Garrido, O. Firuzi, *et al.*, "Dietary phenolic acids and derivatives. Evaluation of the antioxidant activity of sinapic acid and its alkyl esters," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 58, pp. 11273-11280, 2010.
- [30] M. F. Andreasen, A.-K. Landbo, L. P. Christensen, Å. Hansen, and A. S. Meyer, "Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, pp. 4090-4096, 2001.
- [31] P. A. Kroon and G. Williamson, "Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 79, pp. 355-361, 1999.

- [32] F. Karakida, Y. Ikeya, M. Tsunakawa, T. Yamaguchi, Y. Ikarashi, S. Takeda, *et al.*, "Cerebral protective and cognition-improving effects of sinapic acid in rodents," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 30, pp. 514-519, 2007.
- [33] D. H. Kim, B. H. Yoon, W. Y. Jung, J. M. Kim, S. J. Park, D. H. Park, *et al.*, "Sinapic acid attenuates kainic acid-induced hippocampal neuronal damage in mice," *Neuropharmacology*, vol. 59, pp. 20-30, 2010.
- [34] Y.-O. Kim, S.-W. Lee, M.-S. Oh, and H. J. Lee, "Effects of sinapic Acid of 4 vessel occlusion model-induced ischemia and cognitive impairments in the rat," *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, vol. 9, p. 86, 2011.
- [35] H. E. Lee, D. H. Kim, S. J. Park, J. M. Kim, Y. W. Lee, J. M. Jung, *et al.*, "Neuroprotective effect of sinapic acid in a mouse model of amyloid β 1-42 protein-induced Alzheimer's disease," *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 103, pp. 260-266, 2012.
- [36] K. Zare, A. Eidi, M. Roghani, and A. H. Rohani, "The neuroprotective potential of sinapic acid in the 6-hydroxydopamine-induced hemi-parkinsonian rat," *Metabolic brain disease*, vol. 30, pp. 205-213, 2015.
- [37] P. Shahmohamady, A. Eidi, P. Mortazavi, N. Panahi, and D. Minai-Tehrani, "Effect of sinapic acid on memory deficits and neuronal degeneration induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats," *Polish Journal of Pathology*, vol. 69, pp. 266-277, 2018.
- [38] B. H. Yoon, J. W. Jung, J.-J. Lee, Y.-W. Cho, C.-G. Jang, C. Jin, *et al.*, "Anxiolytic-like effects of sinapic acid in mice," *Life sciences*, vol. 81, pp. 234-240, 2007.
- [39] S. J. Roy and P. S. M. Prince, "Protective effects of sinapic acid on lysosomal dysfunction in isoproterenol induced myocardial infarcted rats," *Food and chemical toxicology*, vol. 50, pp. 3984-3989, 2012.
- [40] S. J. Roy and P. S. M. Prince, "Protective effects of sinapic acid on cardiac hypertrophy, dyslipidaemia and altered electrocardiogram in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats," *European journal of pharmacology*, vol. 699, pp. 213-218, 2013.
- [41] T. Silambarasan, J. Manivannan, M. K. Priya, N. Suganya, S. Chatterjee, and B. Raja, "Sinapic acid prevents hypertension and cardiovascular remodeling in pharmacological model of nitric oxide inhibited rats," *PLoS One*, vol. 9, p. e115682, 2014.
- [42] T. Silambarasan, J. Manivannan, M. K. Priya, N. Suganya, S. Chatterjee, and B. Raja, "Sinapic acid protects heart against ischemia/reperfusion injury and H9c2 cardiomyoblast cells against oxidative stress," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 456, pp. 853-859, 2015.
- [43] X. Li, J. Lin, X. Ding, J. Xuan, Z. Hu, D. Wu, *et al.*, "The protective effect of sinapic acid in osteoarthritis: In vitro and in vivo studies," *Journal of cellular and molecular medicine*, vol. 23, pp. 1940-1950, 2019.
- [44] S. Tesaki, S. Tanabe, H. Ono, E. Fukushi, J. Kawabata, and M. WATANABE, "4-Hydroxy-3-nitrophenylacetic and sinapic acids as antibacterial compounds from mustard seeds," *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 62, pp. 998-1000, 1998.
- [45] C. E. Maddox, L. M. Laur, and L. Tian, "Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*," *Current microbiology*, vol. 60, p. 53, 2010.
- [46] D.-S. Lee, J.-Y. Woo, C.-B. Ahn, and J.-Y. Je, "Chitosan-hydroxycinnamic acid conjugates: preparation, antioxidant and antimicrobial activity," *Food chemistry*, vol. 148, pp. 97-104, 2014.
- [47] A. Topcagic, S. C. Zeljkovic, E. Karalija, S. Galijasevic, and E. Sofic, "Evaluation of phenolic profile, enzyme inhibitory and antimicrobial activities of *Nigella sativa* L. seed extracts," *Bosnian journal of basic medical sciences*, vol. 17, p. 286, 2017.

- [48] J. S. Wilson, K. Ganesan, and M. Palanisamy, "Effect of sinapic acid on biochemical markers and histopathological studies in normal and streptozotocin-induced diabetes in wistar rats," *Int J Pharm Pharm Sci*, vol. 3, pp. 115-20, 2011.
- [49] D.-S. Shin, K. W. Kim, H. Y. Chung, S. Yoon, and J.-O. Moon, "Effect of sinapic acid against carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats," *Archives of Pharmacal Research*, vol. 36, pp. 626-633, 2013.
- [50] D.-S. Shin, K. W. Kim, H. Y. Chung, S. Yoon, and J.-O. Moon, "Effect of sinapic acid against dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats," *Archives of pharmacal research*, vol. 36, pp. 608-618, 2013.
- [51] G. Kanchana, W. J. Shyni, M. Rajadurai, and R. Periasamy, "Evaluation of antihyperglycemic effect of sinapic acid in normal and streptozotocin-induced diabetes in albino rats," *Global Journal of Pharmacology*, vol. 5, pp. 33-39, 2011.
- [52] Y.-G. Cherng, C.-C. Tsai, H.-H. Chung, Y.-W. Lai, S.-C. Kuo, and J.-T. Cheng, "Antihyperglycemic action of sinapic acid in diabetic rats," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 61, pp. 12053-12059, 2013.
- [53] Y. Han, H. Qiu, X. Pei, Y. Fan, H. Tian, and J. Geng, "Low-dose sinapic acid abates the pyroptosis of macrophages by downregulation of lncRNA-MALAT1 in rats with diabetic atherosclerosis," *Journal of cardiovascular pharmacology*, vol. 71, pp. 104-112, 2018.
- [54] P. Fresco, F. Borges, C. Diniz, and M. Marques, "New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols," *Medicinal research reviews*, vol. 26, pp. 747-766, 2006.
- [55] E. A. Hudson, P. A. Dinh, T. Kokubun, M. S. Simmonds, and A. Gescher, "Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells," *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, vol. 9, pp. 1163-1170, 2000.
- [56] 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," *Toxicology letters*, vol. 192, pp. 119-125, 2010.
- [57] T. Senawong, S. Misuna, S. Khaopha, S. Nuchadomrong, P. Sawatsitang, C. Phaosiri, *et al.*, "Histone deacetylase (HDAC) inhibitory and antiproliferative activities of phenolic-rich extracts derived from the rhizome of *Hydnophytum formicarum* Jack.: sinapinic acid acts as HDAC inhibitor," *BMC complementary and alternative medicine*, vol. 13, p. 232, 2013.
- [58] N. Naganna, K. S. Shanker, P. R. B. Narayana, M. Sunil, D. Koude, K. Venkateshwarlu, *et al.*, "Synthesis and evaluation of anti-oxidant and cytotoxic activities of novel 10-undecenoic acid methyl ester based lipoconjugates of phenolic acids," *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, vol. 13, pp. 26-32, 2017.
- [59] C. Eroğlu, E. Avci, H. Vural, and E. Kurar, "Anticancer mechanism of Sinapic acid in PC-3 and LNCaP human prostate cancer cell lines," *Gene*, vol. 671, pp. 127-134, 2018.
- [60] M. Kampa, V.-I. Alexaki, G. Notas, A.-P. Nifli, A. Nistikaki, A. Hatzoglou, *et al.*, "Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action," *Breast Cancer Research*, vol. 6, p. R63, 2004.
- [61] J. Zhang, L. D. Melton, A. Adaim, and M. A. Skinner, "Cytoprotective effects of polyphenolics on H₂O₂-induced cell death in SH-SY5Y cells in relation to their antioxidant activities," *European Food Research and Technology*, vol. 228, pp. 123-131, 2008.
- [62] G. J. Fan, X. L. Jin, Y. P. Qian, Q. Wang, R. T. Yang, F. Dai, *et al.*, "Hydroxycinnamic acids as DNA-cleaving agents in the presence of Cu^{II} ions: mechanism, structure–activity

- relationship, and biological implications," *Chemistry—A European Journal*, vol. 15, pp. 12889-12899, 2009.
- [63] M. A. Ansari, M. Raish, A. Ahmad, S. F. Ahmad, S. Mudassar, K. Mohsin, *et al.*, "Sinapic acid mitigates gentamicin-induced nephrotoxicity and associated oxidative/nitrosative stress, apoptosis, and inflammation in rats," *Life sciences*, vol. 165, pp. 1-8, 2016.
- [64] G. Dikmen, G. Guney, and L. Genc, "Characterization of solid lipid nanoparticles containing caffeic acid and determination of its effects on MCF-7 cells," *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, vol. 10, pp. 224-232, 2015.
- [65] U. Bairagi, P. Mittal, J. Singh, and B. Mishra, "Preparation, characterization, and in vivo evaluation of nano formulations of ferulic acid in diabetic wound healing," *Drug development and industrial pharmacy*, vol. 44, pp. 1783-1796, 2018.
- [66] T. Arasoglu, S. Derman, and B. Mansuroglu, "Comparative evaluation of antibacterial activity of caffeic acid phenethyl ester and PLGA nanoparticle formulation by different methods," *Nanotechnology*, vol. 27, p. 025103, 2015.
- [67] M. Ersoz, A. Erdemir, D. Duranoglu, D. Uzunoglu, T. Arasoglu, S. Derman, *et al.*, "Comparative evaluation of hesperetin loaded nanoparticles for anticancer activity against C6 glioma cancer cells," *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, vol. 47, pp. 319-329, 2019.
- [68] M. Kumar, "Nano and microparticles as controlled drug delivery devices," *J. Pharm. Pharm. Sci*, vol. 3, pp. 234-258, 2000.
- [69] K. K. Niba Ibrahim, B. Dineshkumar and Smitha K. Nair, "An Overview On Nanosphere Drug Delivery," *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, vol. 5, pp. 192-198, 2018.
- [70] C. Vauthier and K. Bouchemal, "Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles," *Pharmaceutical research*, vol. 26, pp. 1025-1058, 2009.
- [71] C. Mora-Huertas, H. Fessi, and A. Elaissari, "Polymer-based nanocapsules for drug delivery," *International journal of pharmaceutics*, vol. 385, pp. 113-142, 2010.
- [72] G. Leyva-Gómez, E. Piñón-Segundo, N. Mendoza-Muñoz, M. Zambrano-Zaragoza, S. Mendoza-Elvira, and D. Quintanar-Guerrero, "Approaches in Polymeric Nanoparticles for Vaginal Drug Delivery: A Review of the State of the Art," *International journal of molecular sciences*, vol. 19, p. 1549, 2018.
- [73] Y. Çırpanlı, "Kamptotesin İçeren Polimerik ve Oligosakkarit Bazlı Nanopartiküler Formülasyonların Geliştirilmesi ve In Vitro-In Vivo Değerlendirilmesi," *Farmasötik Teknoloji*, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2009.
- [74] M. P. Desai, V. Labhasetwar, E. Walter, R. J. Levy, and G. L. Amidon, "The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent," *Pharmaceutical research*, vol. 14, pp. 1568-1573, 1997.
- [75] S. Derman, Kızılbaş, K. and Akdetse, Z., "Polymeric nanoparticles," *Mühendislik ve Fen bilimleri Dergisi*, vol. 31, pp. 109-122, 2013.
- [76] S. a. A. BERK, İ. , s. 60(2):p. 180-184., "Nanopartikül: Geleceğin Korkulu Rüyası," *Tuberk Toraks*, vol. 60(2) pp. 180-184, 2012.
- [77] D. M. Brown, M. R. Wilson, W. MacNee, V. Stone, and K. Donaldson, "Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines," *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 175, pp. 191-199, 2001.
- [78] İ. Özcan, "Kemiğe Hedeflemek İçin Sentezlenen Biyolojik Parçalanabilen Polimerler Kullanılarak Hazırlanan Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Tasarımı ve In Vitro – In Vivo Değerlendirilmesi," Y.L, *Farmasötik Teknoloji A.B.D*, Ege Üniversitesi, İzmir, 2008.

- [79] X. S. Wu and N. Wang, "Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: biodegradation," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 12, pp. 21-34, 2001.
- [80] E. Ozakar, "Etkin Madde Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması Ve In Vitro Değerlendirilmesi," *Farmasötik Teknoloji*, Atatürk Üniversitesi, 2014.
- [81] I. Vroman and L. Tighzert, "Biodegradable polymers," *Materials*, vol. 2, pp. 307-344, 2009.
- [82] C. Engineer, J. Parikh, and A. Raval, "Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System," *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, vol. 25, 2011.
- [83] R. Saadati and S. Dadashzadeh, "Marked effects of combined TPGS and PVA emulsifiers in the fabrication of etoposide-loaded PLGA-PEG nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation," *International journal of pharmaceutics*, vol. 464, pp. 135-144, 2014.
- [84] J. Jalvandi, M. White, Y. Gao, Y. B. Truong, R. Padhye, and I. L. Kyratzis, "Polyvinyl alcohol composite nanofibres containing conjugated levofloxacin-chitosan for controlled drug release," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 73, pp. 440-446, 2017.
- [85] M. G Nava-Arzaluz, E. Piñón-Segundo, A. Ganem-Rondero, and D. Lechuga-Ballesteros, "Single emulsion-solvent evaporation technique and modifications for the preparation of pharmaceutical polymeric nanoparticles," *Recent patents on drug delivery & formulation*, vol. 6, pp. 209-223, 2012.
- [86] S. Brynjelsen, M. Doty, J. E. Kipp, N. Jayswal, and K. Narayanan, "Preparation of submicron sized nanoparticles via dispersion lyophilization," ed: Google Patents, 2004.
- [87] S. L. Pal, U. Jana, P. K. Manna, G. P. Mohanta, and R. Manavalan, "Nanoparticle: An overview of preparation and characterization," *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 1, pp. 228-234, 2011.
- [88] M. Iqbal, N. Zafar, H. Fessi, and A. Elaissari, "Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation," *International journal of pharmaceutics*, vol. 496, pp. 173-190, 2015.
- [89] D. Noviendri, I. Jaswir, M. Taher, F. Mohamed, H. M. Salleh, I. A. Noorbatcha, *et al.*, "Fabrication of fucoxanthin-loaded microsphere (F-LM) by two steps double-emulsion solvent evaporation method and characterization of fucoxanthin before and after microencapsulation," *Journal of oleo science*, vol. 65, pp. 641-653, 2016.
- [90] G. Yelkenci, "Juglon Yüklü Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu," *YL, Moleküler Biyoloji ve Genetik A.B.D, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul*, 2015.
- [91] Y. Zhang, N. Kohler, and M. Zhang, "Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake," *Biomaterials*, vol. 23, pp. 1553-1561, 2002.
- [92] S. Chang, H. Hamajima, I. Amin, T. Yanagita, N. M. Esa, and M. Baharuldin, "Cytotoxicity effect of oil palm (*Elaeis guineensis*) kernel protein hydrolysates," *International Food Research Journal*, vol. 21, p. 909, 2014.
- [93] G. Terzioğlu, A. Keskin, and G. Demirel, "Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması," *Turk J Immunol*, vol. 1, pp. 74-89, 2013.
- [94] F. J. Holler, D. A. Skoog, and S. R. Crouch, "Chapter 1," *Principles of Instrumental Analysis (6th ed.)*. Cengage Learning, p. 9, 2007.
- [95] N. S. Çimen, "Proteinlerin Poliakrilik Asit ile Suda Çözünmeyen Kompleksleri," *Fen Bilimleri Enstitüsü, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul*, 2006.
- [96] P. Misra and M. A. Dubinskii, *Ultraviolet spectroscopy and UV lasers*: CRC Press, 2002.

- [97] K. Ö. Dizer, "Kraft Kağıt Üretiminde Zeta Potansiyelin Kağıt Kalitesine Etkisi," YL, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kara Elmas Üniversitesi, Zonguldak, 2010.
- [98] G. B. Kılıç and A. G. Karahan, "FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ (FTIR) SPEKTROSKOPİSİ VE LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TANISINDA KULLANILMASI," *GIDA/The Journal of FOOD*, vol. 35, 2010.
- [99] F. Van de Voort, "Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis," *Food Research International*, vol. 25, pp. 397-403, 1992.
- [100] D. Skoog, F. Holler, and T. Nieman, "An introduction to chromatographic separations," *Principles of instrumental analysis, 5th ed.; Skoog, D., Holler, FJ, Nieman, TA, Eds*, pp. 674-700, 1998.
- [101] Ü. Erdoğan. *Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)*. Available: <http://kisi.deu.edu.tr/umit.erdogan/SEM.pdf>
- [102] D. Stokes, *Principles and practice of variable pressure/environmental scanning electron microscopy (VP-ESEM)*: John Wiley & Sons, 2008.
- [103] A. Helmerich, Barnes, D. , "Animal cell culture equipment and techniques.," *Methods Cell Biology* vol. 57, 1998.
- [104] ATCC. (2019). *NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] (ATCC® CCL-1™)*. Available: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-1.aspx>
- [105] B. Grobden, P. De Deyn, and H. Slegers, "Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion," *Cell and tissue research*, vol. 310, pp. 257-270, 2002.
- [106] 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 research notes*, vol. 8, p. 47, 2015.
- [107] G. Cem, L. TAPUL, C. Gazi, and A. All, "C6 SIÇAN GLİOMA HÜCRELERİ ÜZERİNE ALOE EMODİN VE CİSPLATİNİN ETKİLERİNİN İKİ VE ÜÇ BOYUTLU HÜCRE KÜLTÜR MODELLERİNDE İNCELENMESİ," *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, vol. 69, pp. 110-116.
- [108] F. Angius and A. Floris, "Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair," *Toxicology in Vitro*, vol. 29, pp. 314-319, 2015.
- [109] Y. DİNÇER and S. Kankaya, "DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay," *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, vol. 30, pp. 1365-1373, 2010.
- [110] A. F. Fidan, "DNA hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi," *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, vol. 8, pp. 41-52, 2005.
- [111] T. Lindahl, "Repair of intrinsic DNA lesions," *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, vol. 238, pp. 305-311, 1990.
- [112] B. Halliwell and J. M. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press, USA, 2015.
- [113] D. Yüzbaşıoğlu, N. Zengin, and F. Ünal, "Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri," *GIDA*, vol. 39, pp. 179-186, 2014.
- [114] M. Adiloğlu, " Organoklorlu Pestisitlerin Buğday Bitkisi (*Triticum Aestivum* L.) ve Japon Balığı (*Carassius Auratus* L.) Üzerindeki *In vitro* Genotoksik Etkilerinin Comet Tekniği ile Belirlenmesi," YL, Biyoloji Bölümü, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2013.
- [115] D. Yüzbaşıoğlu, E. A. Yılmaz, and F. Ünal, "Antidepresan ilaçlar ve genotoksisite," *TÜBAV Bilim Dergisi*, vol. 9, pp. 17-28, 2016.
- [116] B. Rydberg and K. J. Johanson, "Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells," in *DNA repair mechanisms*, ed: Elsevier, 1978, pp. 465-468.
- [117] O. Ostling and K. J. Johanson, "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 123, pp. 291-298, 1984.

- [118] N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice, and E. L. Schneider, "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells," *Experimental cell research*, vol. 175, pp. 184-191, 1988.
- [119] A. R. Collins, "The comet assay for DNA damage and repair," *Molecular biotechnology*, vol. 26, p. 249, 2004.
- [120] M. H. Green, J. E. Lowe, C. A. Delaney, and I. C. Green, "Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells," in *Methods in enzymology*. vol. 269, ed: Elsevier, 1996, pp. 243-266.
- [121] M. DİKİLİTAŞ and A. KOÇYİĞİT, "Canlılarda "tek hücre jel elektroforez" yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi," *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, vol. 14, pp. 77-89, 2010.
- [122] C. Gedik, S. Ewen, and A. Collins, "Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells," *International journal of radiation biology*, vol. 62, pp. 313-320, 1992.
- [123] P. L. Olive, G. Frazer, and J. P. Banáth, "Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay," *Radiation Research*, vol. 136, pp. 130-136, 1993.
- [124] M. Vasquez and R. Tice, "Comparative analysis of apoptosis versus necrosis using the single cell gel (SCG) assay," *Environ Mol Mutagen*, vol. 29, p. 53, 1997.
- [125] D. W. Fairbairn, D. K. Walburger, J. J. Fairbairn, and K. L. O'Neill, "Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis," *Scanning: The Journal of Scanning Microscopies*, vol. 18, pp. 407-416, 1996.
- [126] ATCC. (2019). *C6 Rattus norvegicus, rat CCL-107*. Available: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-107.aspx?geo_country=tr
- [127] H. Hameed, S. Aydın, A. A. Başaran, and N. Başaran, "Assessment of cytotoxic properties of sinapic acid in vitro," *Turk. J. Pharm. Sci*, vol. 13, pp. 225-232, 2016.
- [128] A. M. Lee-Manion, R. K. Price, J. Strain, L. H. Dimberg, K. Sunnerheim, and R. W. Welch, "In vitro antioxidant activity and antigenotoxic effects of avenanthramides and related compounds," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 57, pp. 10619-10624, 2009.

İletişim Bilgisi: sayanpoyraz@gmail.com

Konferans Bildirileri

1. F.Ş. Poyraz, S. Derman, D. Duranoğlu, M. Ersöz, T. Arasoğlu, B. Mansuroğlu, "Sinapik Asit Yüklü Polimerik Nanopartiküller," 19. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi," pp.119-119, 2017.
2. F.Ş. Poyraz, G. Akbaş, S. Derman, D. Duranoğlu, T. Arasoğlu, B. Mansuroğlu, "Production and Characterization of Sinapic Acid Loaded PLGA Nanoparticles," 4th International Congress on Applied Biological Sciences, pp.220-220, 2018.

Projeler

1. F.Ş. Poyraz, B. Mansuroğlu, "Sinapik Asit Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Fibroblast ve Glioma Hücre Soyları Üzerinde Sitotoksikite ve Genotoksikitesinin İncelenmesi," YTÜ BAP Y.Lisans, FYL-2018-3248.
2. F.Ş:Poyraz, G. Akbaş, S. Derman, D. Duranoğlu, M.Ersöz, B. Mansuroğlu, T. Arasoğlu, "In Vitro Biyolojik Aktivite Çalışması: Sinapik Asit Yüklü Nanopartiküller," TÜBİTAK Projesi, 117Z016.