

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİNAPİK ASİT YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN MCF-7
MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE ANTİKANSER
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Gülşah AKBAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Haziran, 2020

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİNAPİK ASİT YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN MCF-7 MEME
KANSERİ HÜCRELERİNDE ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Gülşah AKBAŞ tarafından hazırlanan tez çalışması 25.06.2020 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

Prof.Dr. Semiha ERİŞEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr.Öğr.Üyesi Melike ERSÖZ, Üye
Demiroğlu Bilim Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “Sinapik Asit Yüklü Nanopartiküllerin MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Antikanser Özelliklerinin 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.

Gülşah AKBAŞ

İmza



Bu alışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 117Z016 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



Biricik Anneanneme

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince sözleriyle cesaret ve umut aşıl原因an, bilgi ve tecrübeleri ile yoluma ışık tutan, hayattaki şanslarımdan biri olarak gördüğüm sevgili danışmanım Sayın Doç.Dr Banu Mansuroğlu'na sağladığı destek ve ayırdığı zaman için minnet duyarım.

Bu tez ve proje çalışmasında, nanopartikül karakterizasyonunda desteklerini esirgemeyen Sayın Doç.Dr Serap DERMAN'a, deneysel tasarım konusunda engin bilgisinden yararlandığımız Sayın Doç.Dr. Dilek DURANOĞLU'na bilgisi ve tecrübesiyle hücre kültüründe desteklerini esirgemeyen Sayın Dr. Öğretim Üyesi Melike ERSÖZ'e ayrıca yüksek lisans deneyimim boyunca desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte çok şey paylaştığımız, zaman kavramı olmaksızın laboratuvarında oldukça verimli ve eğlenceli günler geçirdiğim Fatma Şayan POYRAZ'a, hücre kültürü laboratuvarını ortaklaşa kullandığımız ve o anları unutulmayacak hatıralara dönüştüren Dilsu ÇOLPAN, Cansel KAYA'ya, ekibimize sonradan dahil olan kısa sürede hayatımda önemli bir alanı kaplayan İrem METEOĞLU'na, ayrıca çabalarımın yanı sıra her zaman destekleyen ve sonsuza kadar sürecek dostluklarımızın teşviki olduğunu düşündüğüm başta bu okuldaki ilk arkadaşım Sefanur ERDÖL olmak üzere birlikte vakit geçirdiğimiz günleri en iyi günlerim olarak saydığım ve birbirinden değerli arkadaşlarım Tuğba ATABEY, Kübra TRABZONLU, Akın SUNULU, İlkül AKMAYAN, Sinem KURT, Caner ERTÜRK, Emrah BERTAN, Bilal ÖZTÜRK, Ceren KIRMIZITAŞ, H.Nur AYDIN, Kübra AVCI, Derya TOPUZ ATA, Reyhan AKKUZU, Ayşegül ARZUMAN, Ercan PULAT, Nermin TOPUZOĞULLARI'na

Küçüklüğümde beri hayatımı güzelleştiren, mutluluk kaynaklarım; Aylin TARHAN, Ceren ONBAŞI ve Yasemin KORKMAZ'a hayatımda oldukları için teşekkür ederim.

Hayatımda en büyük emeğe sahip gerek eğitimim gerek hobi alanlarımda her daim desteklerini hissettiğim, karşılıksız çok sevmeyi öğreten ve ben olmayı sağlayan değer yargılarını bana aşıl原因an sevgili annem Nevin AKBAŞ, babam Zafer AKBAŞ, ablalarım Nilüfer AKBAŞ ve Tuğba AKBAŞ DALYAN'a ve onun vasıtasıyla

hayatımıza dahil olan eniştem Volkan DALYAN'a ayrıca bu tezi yazarken gelen minik ama bir o kadar da muhteşem habere,

Motivasyonumu her zaman yüksek tutan ve hayatımın her evresini güzelleştiren Engin AKBAŞ, Sema SÖZÜER ve Sefer SÖZÜER'e minnet duygularımı belirtmek isterim.

Küçüklüğümden beri bana temiz ve daha yaşanılabilir doğayı tecrübeleri ile aktaran, doğanın her zaman bir şifa kaynağı olduğuna inandıran, tezimi ithaf ettiğim biricik anneannem Rahmetli Fatma SÖZÜER'e yokluğuyla kalbimde amansız bir yara açmasına rağmen hayatımda ve eğitimimde ışık olduğu için teşekkür ederim.

Gülşah AKBAŞ



İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ.....	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
TABLO LİSTESİ.....	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	17
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı.....	2
1.3 Hipotez.....	2
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Hücre Bölünmesi ve Hücre Döngüsü.....	3
2.1.1. Hücre Döngüsünün Kontrolü	4
2.2 Apoptoz.....	5
2.3 Kanser	8
2.3.1. Meme Kanseri	8
2.4 Polifenoller.....	9
2.4.1. Fenolik Asitler.....	10
2.5 Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	12
2.6 Nanopartiküller	13
2.6.1. Polimerik Nanopartiküller.....	14
2.7 Deneysel Tasarım.....	18
2.7.1. Plackett-Burman Deneysel Tasarım Metodu	19
2.7.2. Box-Behnken Deneysel Tasarım Metodu	20
3 MATERYAL VE METOT	22
3.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	22
3.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar.....	23
3.3 Tez Çalışmasında Kullanılan Sarf Malzemeler	24
3.4 Sinapik Asit Yüklü Nanopartikül Sentezi.....	24
3.4.1. Optimize Nanopartikül Sentezi	26
3.5 Sinapik Asit Yüklü Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	26

3.6	In vitro Salım Çalışması.....	27
3.7	Hücre Kültürü Çalışmaları	27
3.7.1.	MTT Yöntemi	29
3.7.2.	Hücre Proliferasyon Testi	30
3.7.3.	TUNEL Testi.....	31
3.8	Oksidatif Stres ve Antioksidan Çalışmaları	32
3.8.1.	MCF-7 Hücre Lizatlarının Hazırlanması	32
3.8.2.	Protein Miktar Tayini	32
3.8.3.	MDA Düzeyinin Belirlenmesi	33
3.8.4.	SOD Enziminin Aktivitesinin Tayini	33
3.8.5.	Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi.....	34
3.8.6.	Katalaz Aktivitesi.....	35
3.9	İstatistiksel Analizler.....	36
4	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	37
4.1	Sinapik Asit Yüklü Nanopartükül Sentezinde Kullanılan Parametreler	37
4.2	Optimize Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu	47
4.2.1.	FT-IR Analizi	49
4.2.2.	Morfolojik Analiz (SEM ve AFM)	50
4.2.3.	In vitro Salım Çalışmaları	52
4.3	In vitro Hücre Kültürü Çalışmaları	52
4.3.1.	MTT Yöntemi	52
4.3.2.	Hücre Proliferasyon Testi	55
4.3.3.	TUNEL Testi.....	58
4.4	Oksidatif Stres ve Antioksidan Çalışmaları	60
4.4.1.	Protein Miktar Tayini	60
4.4.2.	MDA Aktivitesi.....	61
4.4.3.	SOD Aktivitesi	62
4.4.4.	GSH Aktivitesi	63
4.4.5.	Katalaz Aktivitesi.....	64
4.5	Öneriler ve Sonuçlar	65
	KAYNAKÇA.....	73
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR.....	82

SİMGE LİSTESİ

rpm	Dakikadaki devir sayısı
g	Gram
kV	Kilo-volt
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
cm	Santimetre
U	Unit
W	Watt
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

IC ₅₀	%50'sini İnhibe Eden İnhibitör Konsantrasyonu
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
Cdk	Siklin bağımlı kinazlar
DCM	Diklorometan
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DoE	Deneysel Tasarım
EE	Enkapsülasyon verimi
EMA	European Medicine Agency
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Fourier Transform Infrared
GA	Glikolik asit
GSH	Redükte Glutasyon
LA	Laktik asit
MCF10A	Tumerojenik Olmayan Meme Epitelyal Hücre Hattı
MCF-7	İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
MDA	Malondialdehit
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
PBS	Fosfat Tamponu
PCNA	Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni
PDI	Çoklu Dağılım İndeksi
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asit
PVA	Polivinil alkol
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
Sa	Sinapik Asit
SaNP	Sinapik Asit Yüklü Nanopartikül
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
TCA	Trikloroasetik Asit
TNRF	Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü
TUNEL	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz aracılı dUTP-Biotin Nick Uç- Etiketleme
UV	Ultraviyole



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 Hücre döngüsünün evreleri (Institute).....	3
Şekil 2. 2 Hücre döngüsündeki kontrol noktaları	4
Şekil 2. 3 Apoptoz mekanizması (TOMATIR 2003)	6
Şekil 2. 4 Anti-apoptotik ve pro-apoptotik genler (Reed 2000)	7
Şekil 2. 5 Sinapik asit	11
Şekil 2. 6 Sinapik asit molekülünün apoptoz mekanizması (Balaji 2014)	11
Şekil 2. 7 Boyutlarına göre nanopartikül çeşitleri (Krishnaswamy and Orsat 2017)	13
Şekil 2. 8 Polimerik nanotaşıyıcı çeşitleri (Cho, Wang et al. 2008).....	15
Şekil 2. 9 Polimerik nanopartiküller (Christoforidis, Chang et al. 2012).....	15
Şekil 2. 10 Polimer çeşitleri(Derman, Kızılbey et al. 2013, Bolhassani, Javanad et al. 2014).....	16
Şekil 2. 11 PLGA sentezi (Ayyoob and Kim 2018)	17
Şekil 2. 12 Deneysel tasarım yönteminin işleyişi (Antony 2014)	19
Şekil 2. 13 Deneysel tasarım yönteminin çeşitleri	19
Şekil 2. 14 Deneysel tasarımda kullanılan matriks örneği (Brereton 2003).....	20
Şekil 2. 15 Deneysel tasarımda kullanılan jeneratörler (Leardi 2013)	20
Şekil 3. 1 Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile SaNP üretilmesi	25
Şekil 4. 1 Cevap yüzey grafikleri	46
Şekil 4. 2 Optimize nanopartiküllere ait boyut dağılım analiz grafiği	48
Şekil 4. 3 Optimize nanopartiküllere ait zeta potansiyel dağılım analiz grafiği.....	49
Şekil 4. 4 Sa, PLGA ve optimize SaNP'ye ait FT-IR spektrumları	50
Şekil 4. 5 Optimize nanopartiküllere ait 60.000X büyütme oranı ile çekilmiş SEM görüntüsü (A), ölçeklendirilmiş SEM görüntüsü (B).....	51
Şekil 4. 6 Optimize nanopartiküllere ait AFM görüntüsü.	51
Şekil 4. 7 Nanopartiküllerin zamana bağlı salım profili.....	52
Şekil 4. 8 (A) Kontrol, Sa (200 µg/ml) ve SaNP (200 µg/ml) ile 24 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin faz kontrast mikroskopunda 5X objektif altında morfolojik görüntüleri (B) Sa ve SaNP ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin yüzde canlılık grafiği.....	53
Şekil 4. 9 (A) Kontrol, Sa (200 µg/ml) ve SaNP (200 µg/ml) ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin faz kontrast mikroskopunda 5X objektif altında	

morfolojik görüntüleri (B) Sa ve SaNP ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin yüzde canlılık grafiği (48 saat).....	53
Şekil 4. 10 (A) Kontrol, Sa (200 µg/ml) ve SaNP(200 µg/ml) ile 72 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin faz kontrast mikroskopunda 5X objektif altında morfolojik görüntüleri (B) Sa ve SaNP ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin yüzde canlılık grafiği (72 saat).....	54
Şekil 4. 11 MCF10A hücrelerinde Sa ve Optimize SaNP'ye ait 24. saat hücre canlılık grafikleri.....	54
Şekil 4. 12 MCF10A hücrelerinde Sa ve SaNP ait 48. saat hücre canlılık grafikleri.....	55
Şekil 4. 13 (A) Kontrol , Sa ve SaNP ile 24 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin PCNA ile immünohistokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x) .(B) Sa ve SaNP'nin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki proliferasyonu (24 saat) (*p<0,05, **p<0,03)	56
Şekil 4. 14 (A) Kontrol, Sa ve SaNP ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin PCNA ile immünohistokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x). (B) Sa ve SaNP'nin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki proliferasyonu (48 saat) (*p<0,05).....	57
Şekil 4. 15 Kontrol, Sa ve SaNP ile 24 saat muamele edilen MCF 10A hücrelerinin PCNA ile immünohistokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x).	57
Şekil 4. 16 (A) Kontrol , Sa ve SaNP ile 24 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x) (B) S Sa ve SaNP'nin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi (24 saat) (**p<0,03).	58
Şekil 4. 17 (A) Kontrol, Sa ve SaNP ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x) (B) Sa ve SaNP'nin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi (48 saat) (*p<0,05, **p<0,03).	59
Şekil 4. 18 Kontrol, Sa ve SaNP ile 24 saat muamele edilen MCF-10A hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x).....	60
Şekil 4. 19 Sa ve SaNP'lerin MCF-7 hücrelerindeki MDA seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat.....	61
Şekil 4. 20 Sa ve SaNP'lerin MCF-7 hücrelerindeki SOD enzim aktivitesi (A) 24 saat (B) 48 saat	62
Şekil 4. 21 Sa ve SaNP'lerin MCF-7 hücrelerindeki GSH seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat.....	63
Şekil 4. 22 Sa ve SaNP'lerin MCF-7 hücrelerindeki katalaz aktivitesi (A) 24 saat (B) 48 saat.....	64

TABLO LİSTESİ

Tablo 4. 1 Plackett Burman Deneysel Tasarım için parametreler ve seviyeleri	38
Tablo 4. 2 Plackett Burman Deneysel Tasarım için deney planı	39
Tablo 4. 3 Plackett-Burman Design Yöntemi ile yapılan sentez sonuçları.....	40
Tablo 4. 4 Plackett-Burman deneysel tasarım metodu ile modellenmiş EE ve Boyut için ANOVA sonuçları.....	41
Tablo 4. 5 Box Behnken Deneysel Tasarım için parametreler ve seviyeleri	42
Tablo 4. 6 Box Behnken Deneysel Tasarım için uygulanan deney planı	42
Tablo 4. 7 Box Behnken Deneysel Tasarım deney sonuçları	43
Tablo 4. 8 Box-Behnken deneysel tasarım metodu ile modellenmiş EE ve boyut için ANOVA sonuçları.....	44
Tablo 4. 9 Optimize formülasyona ait veriler	48

Sinapik Asit Yüklü Nanopartiküllerin MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Antikanser Özelliklerinin İncelenmesi

Gülşah AKBAŞ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Son yıllarda nanopartiküler taşıyıcı sistemler; ilaç, gen, antitümör ve antioksidan ajanların taşınması, biyouyumlu materyallerin oluşturulması açısından önemlidir. Nanopartiküler sistemler, özellikle suda çözünür olmayan moleküllerin suda çözünürlüğünü sağlayarak, bu moleküllerin biyodağılımlarını ve biyoyararlanımlarını arttırmaktadır.

Bitkilerde yaygın olarak bulunan sinapik asit (Sa) geniş spektrumlu farmakolojik özellik gösteren fenolik bir bileşiktir. Bu çalışmada Sa'nın biyolojik sistemdeki kullanımını sınırlayan özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla nanopartiküler sistemlere yüklenmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışmada Sa'nın deneysel tasarım metoduyla molekülün nanopartiküler taşıyıcı sistemlere yüklenmesi gerçekleştirilmiştir. Sinapik asit yüklü nanopartikül (SaNP) için maksimum enkapsülasyon verimini, minimum partikül boyutunu sağlayan proses parametreleri optimize edilmiştir. Optimize nanopartiküller için enkapsülasyon etkinliği %63,4±1,5 ve boyut 170,6±3,6 olarak belirlenmiştir. SaNP ve Sa'nın MCF-7 ve MCF10A hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemi, antiproliferatif etkisi immunositokimyasal olarak PCNA ile apoptotik hücre ölümü ise TUNEL yöntemiyle incelenmiştir. SaNP'lerin MCF-7 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlerde ki IC₅₀ değerleri

sırasıyla; 180, 168 ve 145 µg/ml olarak bulunmuştur. MCF10A hücre hattında; Sa ve SaNP'lerin uygulanan konsantrasyonlarda toksik etki göstermediği belirlenmiştir. Sa ve SaNP'lerin uygulanan dozlarda (100, 150 ve 200 µg/ml) 24 ve 48 saat muamelesi MCF-7 hücrelerinde PCNA proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltırken, apoptoza giden hücre sayısında artış tespit edilmiştir. Sa ve SaNP'nin MCF-7 hücrelerindeki SOD aktivitesi, katalaz aktivitesi, Glutasyon seviyesi, Malondialdehit (MDA) seviyesi düzeyleri analiz edilmiştir. 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda 24 saat SaNP'yle muamele edilen MCF-7 hücrelerinde MDA seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, SOD aktivitesi SaNP'lerin tüm konsantrasyonlarında anlamlı olarak azaldığı, GSH'ın seviyesi Sa ve SaNP'nin uygulanan dozlarında 24 saatte bir azalış olduğu ve katalaz enzimi seviyesinde SaNP uygulanan tüm konsantrasyonlarda 48 saatte anlamlı artış olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular polifenolik bileşiklerin nanopartikül formulasyonlarının oluşturulması ile tedaviye yönelik ilaç tasarımlarının yapılmasına katkı sağlayabilir nitelikte olduğunu göstermektedir. Geliştirilen nanopartiküler formülasyonun diğer hidrofobik biyolojik etken maddeler için de faydalı bir model oluşturacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nanopartikül, sinapik asit, apoptoz, kanser, toksisite

Investigation of Anticancer Properties of Sinapic Acid Loaded Polymeric Nanoparticles on MCF-7 Human Breast Cancer Cell Lines

Gülşah AKBAŞ

Department of Molecular Biology and Genetics

Master's Thesis

Advisor: Assoc.Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Nanoparticulate carrier systems generally used for transport of drugs, genes, antitumor and antioxidant agents is important for the formation of biocompatible materials. Nanoparticulate systems increase the biodistribution and bioavailability of these molecules, especially by providing the water solubility of the non-water-soluble molecules.

Sinapic acid, commonly found in plants, is a phenolic compound with broad-spectrum pharmacological properties. The aim of this study is to improve the properties of sinapic acid (Sa) that limit its use in the biological system and to load it into nanoparticulate systems.

The sinapic acid molecule was loaded into PLGA nanoparticles, optimization of the nanoparticles was achieved by experimental design methods and anticancer properties of the optimized nanoparticles were examined. The encapsulation efficiency for the optimized nanoparticles was found $63,4 \pm 1,5\%$ and the size was found $170,6 \pm 3,6$ nm.

The cytotoxic effect of SaNP and Sa on MCF-7 and MCF10A cell lines was examined by MTT method, antiproliferative effect was investigated by immunocytochemically

PCNA and apoptotic cell death by TUNEL method. The IC₅₀ values of SaNPs in MCF-7 cells at 180, 168 and 145 µg / ml for 24, 48 and 72 h, respectively.

Sa and SaNPs was determined that concentrations applied and do not show toxic effects on MCF10A cell line. Treatment of Sa and SaNPs at doses (100, 150 and 200 µg / ml) for 24 and 48 h showed statistically significant reduction in PCNA proliferation in MCF-7 cells, with an increase in the number of cells leading to apoptosis. SOD activity, catalase activity, glutathione levels, malondialdehyde (MDA) levels of Sa and SaNP in MCF-7 cells were analyzed. In MCF-7 cells treated with SaNP at concentrations of 150 and 200 µg / ml for 24 h, MDA levels were significantly increased compared to the control group, SOD activity was significantly decreased in all concentrations of SaNPs, GSH level was significantly higher in Sa and SaNP administered doses. There was a significant increase in all concentrations of SaNP applied in 48 h.

The findings of this study indicate that polyphenolic compounds can contribute to the design of drugs for treatment by forming nanoparticle formulations. The nanoparticular formulation developed is thought to be a useful model for other hydrophobic biological active substances.

Keywords: Nanoparticle, sinapic acid, apoptosis, cancer, toxicity

1.1 Literatür Özeti

Hücre döngüsü ve hücre ölümü bir denge halinde gerçekleşmektedir. Hücrede herhangi bir hasarın olmaması için hücre döngüsünün bazı evrelerinde kontrol noktaları olmakla beraber hücreyi apoptoza yönlendirici mekanizmalar mevcuttur. Bu dengenin bozulması başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasını tetiklemektedir (Pistritto, Trisciuglio, Ceci, Garufi, & D'Orazi, 2016; Vermeulen, Van Bockstaele, & Berneman, 2003). Kanserin kendi kendine bölünme sinyallerini oluşturması, damar ağını oluşturarak salgıladıkları özel enzimler sayesinde metastaz yapması açısından sağlıklı bir hücreden oldukça farklıdır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun günümüz verilerine göre meme kanseri kadınlarda oldukça sık görülmektedir. Meme kanserinin kalıtsal nedenlere dayandırıldığı çalışmaların sadece %10'luk bir paya sahip olmasından dolayı kalıtsal olmayan nedenlerinin sıralanmasında güçlük yaşanmaktadır. Ayrıca tedavi edilen bireylerde nüks etme olasılığının fazla olması bu kanserin tedavisindeki bir kısıtlamadır. (Parl, 2014).

Polifenoller aromatik halkalar üzerinde birkaç hidroksil grubuna sahip organik bileşiklerdir. Çeşitli hastalıklara karşı koruyucu ve tedavi edici özellikleri literatür çalışmaları tarafından desteklenmektedir (D Archivio et al., 2007; Tsao, 2010). Bu gruba ait fenolik asitler günlük diyetle sıklıkla tüketilmektedir. Sinapik asit molekülü de fenolik asitler ailesine ait bir bileşiktir. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kanser mekanizmasında etkili olduğu görülmektedir. Fizyolojik ortamda düşük çözünürlük gösterdiğinden dolayı biyoyararlanımı yeterli değildir (Sinha et al., 2015).

Polimerik nanopartiküller karakterizasyon çalışmaları nedeniyle optimize edilebilen ve biyolojik ortamda uzun süre salıma teşvik eden, biyoyumlu yapılar olması sayesinde toksik etki göstermeyen ve çözünürlüğü arttırmaya yardımcı modellerdir. Nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesinde katkısı olan, deneysel anlamda zaman ve maliyet tasarrufu yapılmasına olanak sağlayan deneysel tasarım metotları kullanılmaktadır. Bu

sebeple kullanılan eleme ve optimizasyonu sağlayan metotlar, iki seviyeli ve üç seviyeli olacak şekilde tasarlanılarak daha az deney yaparak daha fazla veri elde etmeyi amaçlamaktadır. Bu işlemler çizilen matrisler ve geliştirilen modelleme formülleri ile gerçekleştirilmektedir (Antony, 2014; Vardhan, Mittal, Adena, & Mishra, 2017).

1.2 Tezin Amacı

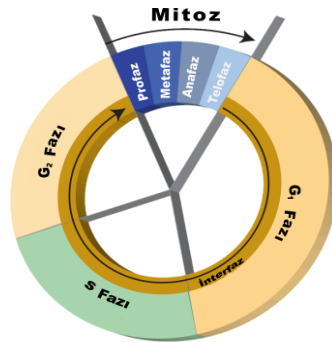
Fizyolojik ortamda çözünürlüğü düşük olan Sinapik asit molekülünün polimerik bir nanopartikül içerisine deneysel tasarım metodundan yararlanılarak yüklenmesi ve nanoformülasyonlarının geliştirilmesi, biyoyararlanımı ve biyouyumluluğu yüksek nanopartiküller elde edilmesidir. Bu amaçla üretilen nanopartiküller ile serbest sinapik asit molekülün karşılaştırılmalı olarak MCF-7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde sitotoksik, proliferatif, apoptotik ve antioksidan etkilerinin incelenmesidir.

1.3 Hipotez

Sinapik asit molekülünün antimikrobiyal, antikanser, antioksidan özellikleri literatürde daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Chalas et al., 2001; Cos et al., 2002; Gaspar et al., 2010; Hudson, Dinh, Kokubun, Simmonds, & Gescher, 2000; Johnson, Dahiya, Olkowski, & Classen, 2008; Niwa, Kato, & Osawa, 1999). Düşük çözünürlüğe sahip sinapik asit molekülünün nanopartiküller sisteme yüklenmesi ile biyolojik sistemdeki kullanımını sınırlayan özelliklerin iyileştirilmesi öngörülmektedir. Geliştirilen nanopartikül formülasyonunun karakter analizleri yapılacaktır. Sinapik asit yüklü nanopartikül ile karşılaştırılmalı olarak serbest sinapik asit molekülünün MCF-7 insan meme kanseri ve MCF10A tumerojenik olmayan meme epitelyal hücre hatları üzerinde MTT çalışması ile sitotoksik, PCNA çalışması ile proliferatif, TUNEL çalışması ile apoptotik etkileri ve MDA, SOD, GSH, CAT analizleri değerlendirilecektir. Bu hedefler doğrultusunda geliştirilen nanoformülasyonun diğer hidrofobik biyolojik etken maddeler için de faydalı bir model oluşturacağı biyoteknoloji, farmakoloji ve diğer alanlarda da yeni bir teröpatik ilaç olarak deneysel çalışmalara için ön çalışma teşkil edeceği düşünölmektedir.

2.1 Hücre Bölünmesi ve Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, hücresel canlılığın devam etmesi için en önemli olaylardan biri olan DNA replikasyonunun, replikasyon öncesi ve esnasına kadar hücresel bileşenlerin iki katına çıkarıldığı, bunun sonucunda da hücre bölünmesinin gerçekleştiği süreçler zinciridir. DNA kopyalanmadan önce, hücrede RNA ve protein sentezi artmakta ve proteinlerin artması sonucu hücresel hacim iki katına çıkmaktadır. Bu evre G_1 evresi olarak bilinmektedir. Burada DNA replikasyonundan önce hazırlık evresi söz konusudur. Gerçekleşen bu evrede S-siklinler devreye girerek, DNA sentezini başlatmak için yeterli maddelerin olduğu sinyali verir ve S evresine geçişi sağlar. S evresi; DNA replikasyonun gerçekleştiği evredir. Hücre G_2 evresine geçer ve bir sonraki aşama olan mitozun gerçekleşmesi için gerekli olan enerjiyi, tübülün ve histon olmayan proteinleri sentezler. Olgunlaşmayı başlatan faktör olarak bilinen MPF bileşiğinin iki alt birimi cdc-2 ve siklin B birleşip aktifleşerek G_2 evresinden mitoz(M) evresine geçmesini sağlar ve böylelikle M-siklinler mitozu başlatır (Barnum & O'Connell, 2014; Junqueira, Carneiro, Kelley, Aytekin, & Solakoğlu, 1993). Bu evre; kromozomun yoğunlaştığı, çekirdek zarının parçalandığı ve iğ ipliklerinin oluştuğu profaz, kromozomların sentromerlerinden iğ ipliklerine bağlandığı metafaz, bu sentromerlerden iki kromatidin birbirinden ayrıldığı anafaz ve sitokinezin tamamlandığı telofaz oluşturmaktadır (Şekil 2.1)

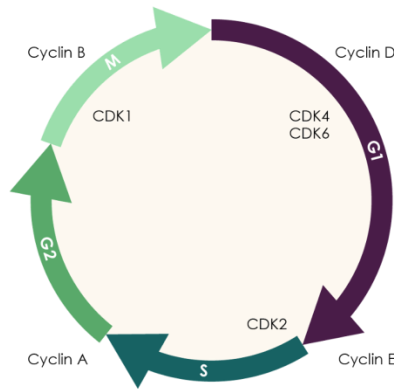


Şekil 2. 1 Hücre döngüsünün evreleri (Institute)

Bazı hücreler sürekli bölünmezler ve döngü geçici veya kalıcı süreli olarak G_0 evresinde kalır. Kas ve sinir hücreleri bu hücelere örnek teşkil eder (Reece et al., 2014).

2.1.1. Hücre Döngüsünün Kontrolü

Hücre bölünmesi ve hücre ölümü belirli bir düzen içerisinde gerçekleşmektedir. Bu düzen dengede olduğu için sabit bir hücre yenilenmesi söz konusudur. Hücre de herhangi bir hasar olmaması için ve bu düzeni devam ettirebilmesi için hücre döngüsünün bazı evrelerinde kontrol noktaları gelişmiştir (Şekil 2.2). Hücre döngüsünde G_1 evresinden S evresine geçişte, G_2 evresinde ve G_2 evresinden M evresine geçişte önemli kontrol noktaları bulunmaktadır. Bu fazlardaki kontrol siklin bağımlı kinazlar(cdk) tarafından gerçekleşir. Siklin bağımlı kinazlar normal şartlar altında inaktiftir ve aktifleşmek için siklinlere ihtiyaç duyarlar. G_1 kontrol noktasındaki siklin D ve E sırasıyla cdk2 ve cdk4 ile bağ kurarlar ve siklin bağımlı kinazları aktif hale getirirler. Siklin D'nin cdk2 ile yapmış olduğu bağ Retinoblastoma(RB) proteinini fosforlamaktadır. Aktifleşen bu proteini takiben Siklin A, cdk2'ye bağlanması ile DNA replikasyonunu başlatır. G_2 evresindeki siklin B ise cdk1 ile kompleks hale geçerek mitozu başlatır. Bu iki kontrol noktasında hasar olmaması durumunda hücre döngüsüne devam eder ve M noktasındaki kontrolü de geçirmesi durumunda hücre bölünmesi gerçekleşmiş olur (Barnum & O'Connell, 2014; Vermeulen et al., 2003).



Şekil 2. 2 Hücre döngüsündeki kontrol noktaları

Telomerler, koruyucu DNA-protein kompleksleridir ve ökaryotik kromozomların uçlarında bulunur. Telomerik DNA'nın tam replikasyonu telomeraz gerektirir. Kesintiye

uğrayan bölgeler bu ribonükleoprotein enzimler tarafından tamir edilir (Chan & Blackburn, 2004).

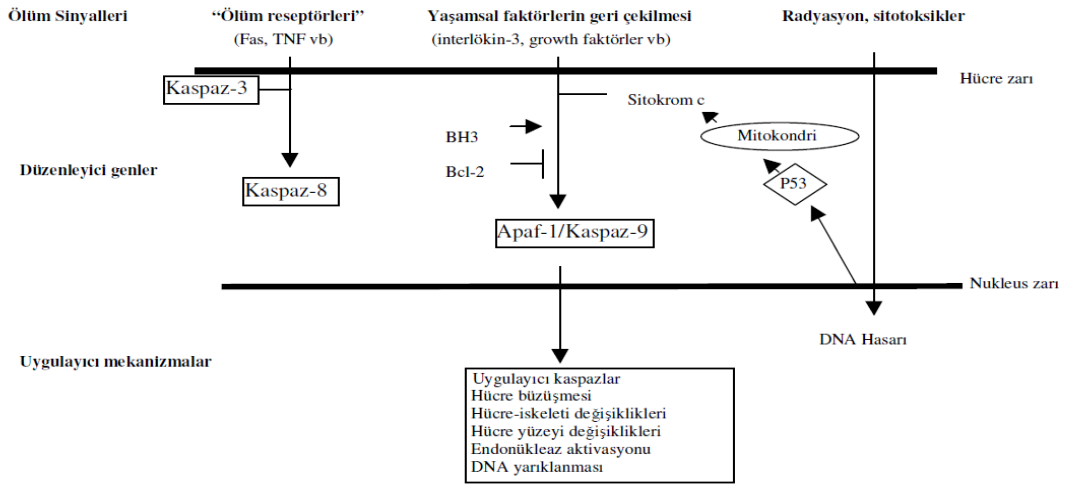
2.2 Apoptoz

Apoptoz diğer adıyla programlı hücre ölümü terimi literatüre 1964 yılında Richard Lockshin adında nobel ödüllü bir biliminsanı tarafından kazandırılmıştır. Morfolojik ve biyokimyasal değişimlere göre isimlendirilen hücre ölümü çeşitleri mevcuttur. Bunlar: kornifikasyon, mitotik hasar, eksitotoksisite, Wallerian dejenerasyonu, paraptozis, entozis, prenekrozisdir (Kroemer et al., 2009). Hücre ölümünü genel olarak iki ana başlık altında incelenmektedir; apoptoz ve nekroz. Nekrozun aksine, apoptoz; komşu hücreler tarafından hücre kalıntılarının fagositozuna yol açan düzenlenmiş, enerjiye bağlı bir hücre ölüm şeklidir. Nekroz morfolojik olarak düzensizdir. Çünkü nekroz gerçekleşirken organeller şişerek hücreyi patlatır. Bazen hücre içeriğini dışarı verdiği için dolayı komşu hücrelerin zarar görmesine bazen de immün sistem tarafından bir enflamasyona neden olabilir. Bu da organizmanın programı dışında gerçekleştiğinden dolayı istenen bir durum değildir. Ancak apoptoz da proteinleri parçalanmış hücreler büzülür ve kendi çekirdek ve DNA'sını parçalayarak immün sistem tarafından yok edilmesi söz konusudur. Dolayısıyla enerji kullanarak hücrenin yapmış olduğu bu ölüm şekline programlı hücre ölümü denir ve embriyolojik dönemden itibaren organizmada görülmektedir (Öktem, Özhan, & Özol, 2001; Ziegler & Groscurth, 2004). Tıpkı hücre döngüsünde olduğu gibi apoptoz mekanizmasında da apoptozu yönlendirici veya ket vurucu bir çok düzenleyiciler vardır. Bu mekanizma ile ilgili olarak iyon kanalları, tümör süpresör proteinleri, seramid ve en büyük öneme sahip mitokondri organelidir.

Apoptozda gerçekleşen bir dizi olaylar zincirinde önemli görevleri üstlenen bazı protein ve genler vardır. Bunlardan başlıcaları p53, Bcl-2/Bax ve kaspazlardır.

Kaspaz (CASPASE; cysteine aspartate specific protease) aktif ve protein kesim bölgesi olarak iki bölgeye ayrılır. Aktif bölge sistein, protein kesim bölgeleri ise aspartik asitten oluşur. İnaktif olan kaspaza pro-kaspaz denmektedir. Bu grup 40'tan fazla proteazın aktifleşmesini sağlar. Proteolizisin başlatıcı (kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz10) veya uygulayıcı yani efektörü (kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7) olarak sınıflandırılabilir.

Başlatıcı ve efektör kaspazın işbirliği sonucunda apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine ve hücrenin apoptoza uğramasına neden olmaktadır (Lüleyap, 2008; TOMATIR, 2003). Apoptoz, bir hücrede kaspaz aracılı dışsal veya içsel yollardan tetiklenebilir. Her iki yolda da efektör apoptotik kaspazı aktive etmeye çalışan apoptozu gerçekleştirmek için başlatıcı bir adımdır. Dışsal apoptotik yolak Şekil 2.3'te görüldüğü gibi ölüm reseptörüne yani dıştan gelen sinyalleri alarak hücreyi apoptoza götürür. Bu yolakta tümör nekroz faktörü reseptörünün (TNFR) hücre yüzeyine maruz kalan yapısal olarak apoptozu indükleyen sinyallemede kritik rol oynayan ölüm domaini (Death Domain; DD) adı verilen bir hücre içi protein-protein etkileşim alanı ile tanımlanan ölüm reseptörlerinin, ilgili protein tümör nekroz faktör (TNF) ailesi ligandları ile etkileşimi ile başlatılır. Konformasyonel değişikliğe uğrayan bu protein kompleksi bağdaştırıcı birkaç proteinle ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşturur, pro-kaspaz-8'in aktifleşmesini tetikler ve başlatıcı kaspaz-8 efektör kaspaz-3'ü aktive etmesi ile sonuçlanır (Nagata, 1997; Pistritto et al., 2016).



Şekil 2. 3 Apoptoz mekanizması (TOMATIR, 2003)

İçsel apoptotik yolakta ise, farklı stres koşullarına yanıt olarak mitokondriyal düzeyde hücre içi sinyaller aracılık eder. Burada mitokondri aktivasyonuna yol açan içerisinde zıt etkileri olan iki alt gruba sahip en önemli faktör Bcl-2 ailesidir. Bu aile pro-apoptotik ve anti-apoptotik genler olarak tabir edilen diğer bir deyişle hem apoptozu tetikleyen hem de apoptozu baskılayan genler bulundurur. Pro-apoptotiklerden bazıları:

Bax, Bad, Bak, Bok, Bid, Bcl-X_s, anti-apoptotiklerden bazıları ise; Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W şeklindedir (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4 Anti-apoptotik ve pro-apoptotik genler (Reed, 2000)

Apoptozda bir diğer önemli etken olan p53 geni, apoptozu destekleyici Bcl-2 ailesi üyesi olan Bax'ı tetikleyerek DNA hasarını ortadan kaldırmak için bir dizi işlem başlatır. Bunun dışında mdm2 veya TNRF ailesi üyesi olan Fas reseptörleri ile de apoptozisi desteklemektedir (Bates & Vousden, 1999). Günümüzde de bir tümör baskılayıcı gen olan p53 genindeki mutasyonlar, kanser tedavi çalışmalarında sıkça tercih edilmektedir.

Apoptoz morfolojik görüntüleme yöntemleri, DNA kırıkları meydana geldiğinden dolayı TUNEL gibi immunositokimyasal yöntemler, agoroz jel elektroforezi gibi biyokimyasal yöntemler, fluorimetrik metodu gibi immunolojik yöntemler ve DNA mikroarrayi gibi moleküler biyolojik yöntemlerle tespit edilebilir (Coşkun & Özgür, 2011; Ziegler & Groscurth, 2004).

Apoptoz bahsedildiği üzere mitotik aktivite ile denge halindedir. Bu dengenin bozulması çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Apoptozun artması ile meydana gelen hastalıklar arasında en bilinenleri; AIDS, insüline bağlı diyabet ve inme gibi hastalıklar görülürken, azalması ile; bazı otoimmün hastalıklar ve kanser görülmektedir.

2.3 Kanser

Canlılığın ilk safhalarında gerçekleşen kontrollü hücre bölünmesi, bireyin gelişimini sağlamaktadır. Gelişen bireyde ise; hücrenin, çevresi ile haberleşmesini sağlayan sinyalleşmeler normal hücrelerde dengeli bir biçimde bölünmeyi ve apoptozu desteklerken, kanserli hücrelerde bu denge tamamiyle bozulur ve kendi büyüme sinyallerini oluşturur (Dilsiz, 2009; Lüleyap, 2008). Normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinin tanımı, kendi bölünme sinyallerini oluşturması, damar ağını oluşturarak ve salgıladıkları özel enzimler sayesinde dokulara yayılarak bazılarının metastaz yapması ve apoptozisten kaçarak hücre dengesini bozması sonucu sınırsız bölünmeleri ile yapılabilmektedir. Bu özelliklere ek olarak kanser oluşum mekanizmaları; hücre kontrol noktalarında meydana gelen p53 gibi tümör süpressör genlerinde oluşan bir mutasyondan kaynaklı, hasarlı bazlar ve kromozom kopmalarından dolayı yaşanan DNA lezyonları da kanserin nedeni tam olarak bilinmemesine rağmen tedaviye destek sağlamaktadır. Kanseri biyolojik yaş, hormonlar, metabolizma, bağışıklık, genetik yatkınlık, tamir mekanizmasındaki hasar ve mutasyonlar gibi endojen kaynaklı ve radyasyon, kimyasal ajanlar, tümöre neden olan virüsler, kötü yaşam tarzları (beslenme, hareketsizlik, sigara içme...) gibi ekzojen kaynaklı risk faktörlerinden oluşmaktadır. (Wu, Zhu, Thompson, & Hannun, 2018)

2.3.1. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlarda en sık rastlanan kanser türüdür. Epidemiyolojik çalışmalar sonucu ortaya çıkan meme kanseri vakalarının yaklaşık %10'unun kalıtsal olduğunu göstermektedir. Geriye kalan %90'ının açıklanamayan faktörler veya sporadik olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum meme kanseri nedenlerini sıralamakta güçlük çıkarmaktadır (Parl, 2014). Meme kanseri 4 aşamalı evreye ayrılmaktadır. Aşama 0, yerinde karsinomdur sadece kanser hücreleri bulunmaktadır. Aşama 1 tümör 2cm veya daha küçüktür ve lenf düğümlerinde az sayıda kanser hücresi bulunur. Aşama 2, tümör 2 ila 5 cm arasındadır ve maksimum üç lenf nodunda ve/veya göğsün içindeki lenf nodlarında bulunur. Aşama 3, 5 cm veya daha küçüktür ve kanser hücreleri 4 ila 9 aksiller lenf nodunda veya internal meme lenf nodlarında bulunur. Aşama 3 kendi arasında üç alt kola ayrılmaktadır ve son iki alt kolu enflamatuvar meme kanseridir. Aşama 4 ise; metastatik meme kanseridir (Sobin, Gospodarowicz, & Wittekind, 2011).

Bu aşamalar meme kanseri tedavi aşamasında bir hayli önem kazanmaktadır. Tedavi edilen bireylerde nüks etme olasılığı fazladır. Gerek meme kanserinin açıklanamayan nedenleri gerekse aşamaları ve bu aşamaların nüks etme olasılığı yeni tedavilerin önemini arttırmaktadır.

2.4 Polifenoller

Polifenoller; aromatik halkalar üzerinde birkaç hidroksil grubuna diğer bir deyişle polifenol yapısına sahip olan bir organik bileşiktir ve bitki kaynaklı gıdaların yaygın bileşenleridir. Antioksidan vitaminler, karotenoidler ve minerallerden daha fazla tüketildiği bilinmektedir (Scalbert, Johnson, & Saltmarsh, 2005). Polifenoller içerdikleri fenol halkalarının sayısına ve bu halkaları birbirine bağlayan yapısal elemanlara göre sınıflandırılabilir. Bunlar: flavonol, flavanol, izoflavon, flavon, flavanon, antosiyanin olarak alt gruplara ayrılan ve yapısında heterojen gruplar içeren; flavonoidler, benzoik asit ve türevleri, sinamik asit ve türevleri olarak iki alt başlıkta incelenecek olan; fenolik asitler, daha fazla (-OH) grubuna sahip fenolik alkoller, en yaygın olanı resveratrol, stilbenler ve keten, susam gibi birçok tahılda bulunan, anaerobik bağırsak mikroorganizmaları tarafından metabolize edilen ve en tanınmışları enterolakton ve enterodiol olan lignanlardır (BAYIR, AKSOY, & KOÇYİĞİT, 2019; Tsao, 2010).

Polifenollerin etkileri hala çeşitli alanlarda çalışılmaktadır; fakat farklı alt gruplarının olmasından dolayı aktivite bakımından geniş bir spektrum gösterdiği yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Polifenoller, farklı oksidatif stres biyobelirteçlerinin durumunu iyileştirmektedir. Ayrıca nörodejeneratif hastalıklara ve beyin fonksiyonlarının bozulmasına karşı koruyucu etkilerine dair kanıtlar elde edilmiştir. Hem antioksidan hem de proksidan etkileri, hücre fizyolojik süreçleri üzerinde zıt etkilerle tarif edilmiştir. Bu sebeple, apoptozu indükleyebilir ve tümör büyümesini engelleyebilirler. Polifenollerin adiposit öncesi farklılaşmayı inhibe ederek, adiposit proliferasyonunu azaltarak, adiposit apoptozunu uyararak, lipogenezi baskılayarak, yağ asitlerinin lipolizine ve beta oksidasyonuna katkıda bulunarak obeziteyi etkilediği, özellikle flavonoidlerin çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki anti-mikrobiyal aktivitesinde etkili olduğu düşünülmektedir (BAYIR et al., 2019; D Archivio et al., 2007; Scalbert et al., 2005; Tsao, 2010; Weichselbaum & Buttriss, 2010).

2.4.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitler meyve, sebze ve tahıllarda oldukça fazla bulunmaktadır ve diyetle bağı olarak yaklaşık günde 25 mg ila 1 g tüketilmektedir. Temel iskelet aynı kalmasına rağmen, fenolik asitler aromatik halka üzerindeki hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonunda farklılık gösterir. Fenolik asitler bir diğer deyişle fenolkarboksilik asitler, bir fenolik halka ve en az bir organik karboksilik asit fonksiyonu maddeleri içeren fenollerdir (Goleniowski, Bonfill, & Cusido). Fenolik halkaya bağı yan zincirin karbon birimlerine bağı olarak iki alt gruba ayrılabilir. Bunlar: hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitlerdir.

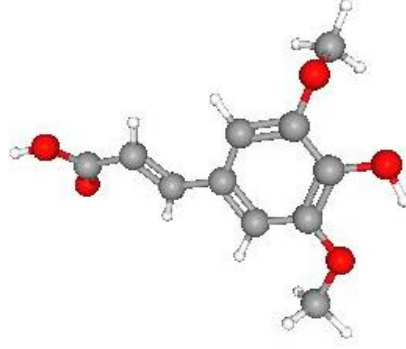
Hidroksibenzoik asit; insan diyetine katkısı düşük olduğu için ve insan sağığında çok önemli bir rol oynamamasından dolayı önerilmemektedir. Gallik asit en fazla çayda, protokatekik asit ise ahududu gibi kırmızı meyvelerde de bulunabilmektedir. C6-C1 yapısına sahiptir (Abbas et al., 2017; Goleniowski et al.).

Hidroksisinnamik asitler; C6-C3 yapısına sahiptir. Genelde gövde, tahıl ve tohumda esterleşmiş formda bulunan bu grup, sebze ve meyvelerde serbest formda da nadiren bulunmaktadır. Hidroksisinnamik asit yapılarının çeşitliliğı, aromatik halka üzerindeki hidroksil gruplarının sayısı ve konumu ile verilir. Doğada bulunan HCA bileşikleri p-kumarik, kafeik, ferulik ve sinapik asitlerdir (Vinholes, Silva, & Silva, 2015).

2.4.1.1 Sinapik Asit

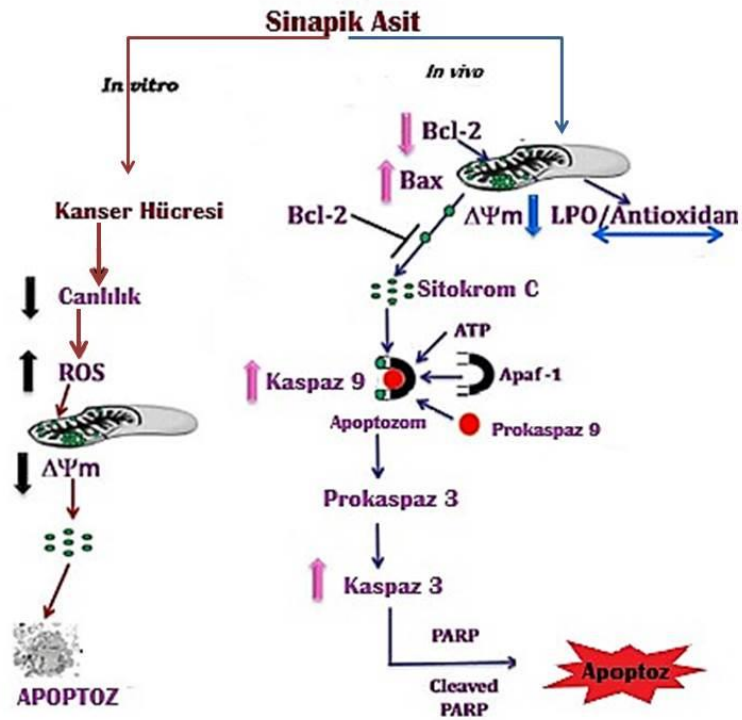
Fenolik bileşiklerden hidrosisinnamik asit grubuna ait olan Sinapik asit (Sa), çilek, yulaf, brokoli, adaçayı yaprağı gibi bitkilerin hemen hemen tüm kısımlarında bulunabilen fenilpropanoid ailesinin bir üyesidir (HAMEED, 2014; Zych, Kaczmarczyk-Sedlak, Wojnar, & Folwarczna, 2018). 224,21 g/mol moleköl ağırlığına sahip Sa'nın moleköl formülü $C_{11}H_{12}O_5$ 'tir (Şekil 2.5) (Murray, Norris, & Bawendi, 1993; Nićiforović & Abramović, 2014). Sa'nın literatür çalışmalarına katkı sağılayacak şekilde geniş spektrumlu farmakolojik aktivitelere sahiptir. Sa'nın antiinflamatuvar (Yun et al., 2008), antimikrobiyal (Johnson et al., 2008), kardiyoprotektif (Roy & Prince, 2012), antihiperglisemik (Kanchana, Shyni, Rajadurai, & Periasamy, 2011), antikanser(Hudson et al., 2000), anksiyolitik(Yoon et al., 2007), hepatoprotektif(Wilson, Ganesan, & Palanisamy, 2011), nöroprotektif(H. E. Lee et al., 2012) ve antioksidan(Chalas et al.,

2001; Cos et al., 2002; Gaspar et al., 2010; Niwa, Doi, Kato, & Osawa, 1999) gibi özelliklere sahip olduğu kazandırılan çalışmalar sonucunda belirtilmiştir.



Şekil 2. 5 Sinapik asit

Vücutta serbest oksijen türevleri ile bunları temizleyici ajanlar olarak bilinen endojen kaynaklı antioksidanlar bazen dengede olmayabilir. Bu da oksidatif strese neden olmakta ve kanser, nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Burada eksojen antioksidanlar reaktif oksijen türlerini temizleyerek hastalıklara karşı koruma sağlayabileceği düşünülmektedir (Chen, 2016).



Şekil 2. 6 Sinapik asit molekülünün apoptoz mekanizması (C Balaji, 2014)

Mitokondriyal membran potansiyelinin ($\Delta\psi_m$) depolarizasyonu, apoptojenik faktörlerin salınmasına ve oksidatif fosforilasyon kaybına neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.6). Ayrıca yapılan çalışmalar anti-apoptotik ve pro-apoptotik genlerinde kaspaz yollarını aktive ederek apoptozisi desteklediğini göstermektedir (C Balaji, 2014).

Sa molekülü birkaç hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda yüksek dozlarına kıyasla, düşük dozlarında toksik özellik görülmediği belirtilmekte ve anti-proliferatif, antikanser aktivite göstererek farmakolojiye katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Hameed, Aydin, Başaran, & Başaran, 2016).

2.5 Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

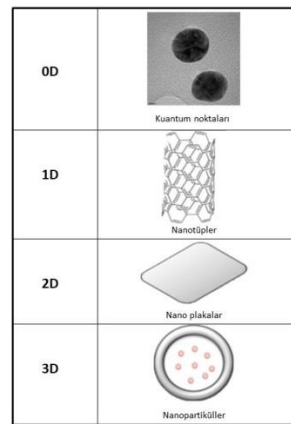
Oksidanlar elektronları kabul edebilen bileşiklerdir. Diğer bir deyişle oksitleyici maddelerdir ve oksijen de bu gruba dahildir. Aksine indirgeyici maddeler elektron veren maddelerdir. Oksidasyon ise; elektron kaybının meydana geldiği bir süreçtir. Redoks reaksiyonları adı verilen tepkimelerde biyolojik regülasyon için temel rol oynayan bir oksidasyon işleminde her zaman mevcuttur. Genellikle oksijen kaybının olduğu bir indirgeme işlemi ve bir oksidasyon işleminde oksijen kazancı vardır. Bu indirgeyicilere antioksidan denilmektedir (Packer, 2001). Antioksidanlar; serbest radikallere karşı koyan, bunların neden olduğu hasarı önleyen ve oksidasyon hızını engelleyen veya yavaşlatan maddelerdir. Vücutta oksidatif metabolizma ve enerji üretimi sırasında üretilen serbest radikaller, tek sayıda veya daha fazla sayıda eşlenmemiş elektron bulunan moleküllerdir. Genel olarak oksidanlar yani reaktif oksijen türleri (ROS) radikal ve radikal olmayan grupta sınıflandırılabilir. Reaktif oksijen türleri kısa ömürlü oldukları için tespiti zordur. Devam eden oksidatif hasar genellikle amino asitlerin, nükleik asitlerin ve lipid peroksidasyonunun türevlerini içeren ikincil ürünlerin ölçümü ile analiz edilir (Kohen & Nyska, 2002). Dolayısıyla, serbest radikallerdeki artış lipid peroksidasyon ürünü olan Malondialdehit (MDA) seviyesindeki artışa neden olmakta ve bu sebeple stres markeri olarak kullanılmaktadır (Gaweł, Wardas, Niedworok, & Wardas, 2004). Reaktif oksijen türleri, hem endojen (mitokondri, peroksizomlar, endoplazmik retikulum, fagositik hücreler vb.) hem de ekzojen (kirlilik, alkol, tütün dumanı, ağır metaller, geçiş metalleri, endüstriyel çözücüler, pestisitler, halotan, parasetamol ve radyasyon gibi bazı ilaçlar) kaynaklardan oluşabilmektedir.

Oluşan bu oksidatif hasar sonucu organizmada lipid, DNA, protein gibi yaşamsal moleküllerin hasarına neden olmaktadır (Phaniendra, Jestadi, & Periyasamy, 2015).

Antioksidanlar iki alt gruba ayrılmaktadır: antioksidan enzimler ve düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar. Düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar insan diyeti ile birlikte alınırken enzimatik olan antioksidanlar ise serbest radikallere karşı üretilen birinci basamaktır. Enzimatik antioksidanlar: Reaktif oksijen türlerine karşı ilk savunma hattını oluşturan süperoksit dismutaz (SOD), hidrojen peroksidi suya parçalayan glutatyon peroksidaz (GPx), hidrojen peroksidin oksijene dönüşümünü sağlayan katalazdır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise; vitaminler, polifenollerdir (ASLANKOÇ et al.; KARABULUT & GÜLAY, 2016; Ratnam, Ankola, Bhardwaj, Sahana, & Kumar, 2006). Bu nedenle, oksidatif stres biyobelirteci olarak antioksidan tüketiminin araştırılması antioksidan miktarlarındaki azalış veya onların metabolitlerindeki artışın değerlendirilmesi ile mümkün olmaktadır.

2.6 Nanopartiküller

Nano kelimesi Yunanca da “cüce” anlamına gelen “nanos” kelimesinden gelmekte ve bir büyüklüğün milyarda birini belirtmek için bu ölçek birimi kullanılmaktadır. Bundan dolayı 1000nm’den daha küçük bir boyuta sahip malzemelerin üretimi "nanomalzeme" olarak adlandırılırlar. Bununla birlikte 1960’ların sonlarında meydana gelen nanoteknoloji, tasarlanılmış boyutları sayesinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik ortamlarda üretilmek ve kullanılmak üzere bir öncül sergileyen malzeme ve cihazların bilimi olarak görülmektedir.



Şekil 2. 7 Boyutlarına göre nanopartikül çeşitleri (Krishnaswamy & Orsat, 2017)

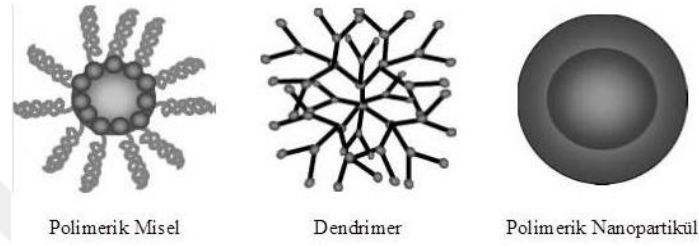
Nanomalzemeler boyutlarına göre dört gruba ayrılmaktadır. Bunlar: nanopartikülleri kapsayan üç boyutlu, nanometre kalınlığındaki filmleri kapsayan iki boyutlu, nanoteller gibi bir boyutlu ve kuantum noktaları gibi boyutsuz nanomalzemelerdir. Dolayısıyla bu nanomalzemeler analitik araçlar, nano görüntüleme araçları, nano cihazlar, klinik ve toksikolojik sorunları çözme, yeni terapötikler ve kontrollü salınım gibi hedefler oluşturmaktadır (Tiwari, Tiwari, & Kim, 2012).

Farklı boyut, şekil, kompozisyon ve işlevselliklere sahip birçok nanopartikül çeşidi vardır (Şekil 2.7). Sulu sistemlerde kendiliğinden bir araya gelen tek veya çok katmanlı bir lipid yapısı içeren küresel bir vezikül olan lipozom sistemler; tasarımları, hidrofilik bileşiklerin ve ilaçların lipid tabakasının tutulmasına izin verebileceği için terapötik taşıyıcılar olarak, arzu edilen hücreler içerisinde teşhis ve terapötik ajanların birikimini arttırmak için hedefleme ligandları ile fonksiyonelleştirilmiş bir şekilde, biyoyumlu polimerler ile kullanılmaktadır. Albümine bağlı nanopartiküller (nab); kan dolaşımında hidrofobik molekülleri taşımak için endojen albümin yollarını kullanarak ilaç dağıtım aracı olarak kullanılabilir. Tamamen metal öncüllerinden yapılmış olan metal nanopartiküllerinden demir oksit nanopartiküller; biyoyumlu ve pasif/aktif bir hedefleme görüntüleme ajanı olarak geniş çapta incelenmektedir. Altın nanopartikülleri ise; serbest elektronların ışıkla eşsiz etkileşimi sayesinde, biyolojik görüntüleme, biyobelirteç ve terapötik uygulamalar gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Sıfır boyut diye tabir edilen kuantum noktası; çapı 10 nm'den az olan yarı iletken parçacıklardır. Bu partiküllerin emilim spektrumları çok geniştir. Bu nedenle, fotokataliz, fotoğraf optiği ve elektronik cihazlarda çok önemli malzemelerdir. Biyoyumlu ve biyolojik olarak bozunabilir olan organik bazlı polimerik nanopartiküller; terapötik taşıyıcılar olarak kullanılmaktadır (Khan, Saeed, & Khan, 2019; Wang & Wang, 2014).

2.6.1. Polimerik Nanopartiküller

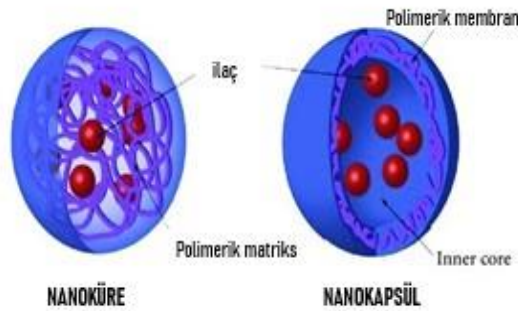
Polimerik nanotaşıyıcılar işlevlerine ve şekillerine göre polimerik miseller, dendrimerler ve polimerik nanopartiküller şeklinde sınıflandırılırlar. Polimerik miseller, sulu ortamda hidrofobik bir maddenin yer aldığı çekirdek ve hidrofilik bir kabuk yapısını oluşturmak için bir araya gelen bir yapıya sahiptir. Hedefleme ligandları, görüntüleme ve terapötik ajanlar içeren çok fonksiyonlu polimerik miseller maddenin çözünürlüğünü arttırmak ve taşıyıcı bir yapı olarak aktif olarak geliştirilmektedir (Cho, Wang, Nie, & Shin, 2008).

Dendrimerler, merkezi bir çekirdeğe ve aşırı dallanmış katmanlara sahip makromoleküllerdir. Boyutları ve özel yapıları sonucu olarak suda çözünürlüğü artırma, etken maddenin yarı ömrünü arttırma ve salımı kontrol etme gibi özellikleri nedeniyle dendrimerler, ilaç ve gen taşıyıcıları olarak geliştirilirler (Wang & Wang, 2014; Yadav, Almokdad, Sumia, & Debe, 2019). Polimerik nanopartiküller ise; biyolojik olarak uyumlu ve toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen bir polimerden oluşan nano yapılarıdır (Şekil 2.8) (Bhatia, 2016).



Şekil 2. 8 Polimerik nanotaşıyıcı çeşitleri (Cho et al., 2008)

Polimerik nanopartiküller, hazırlama yöntemine bağlı olarak nanoküre veya nanokapsül şeklinde sınıflandırma yapılmaktadır (Şekil 2.9). Nanoküreler, etken maddenin küresel yüzeyin dış sınırında adsorbe edilen matris parçacıklarıdır. Nanokapsüller ise; etken maddenin enkapsüle edildiği yani polimer bir zar içerisine hapsedildiği yapılarıdır (Bhatia, 2016; Derman, Kızılbey, & Akdeste, 2013).

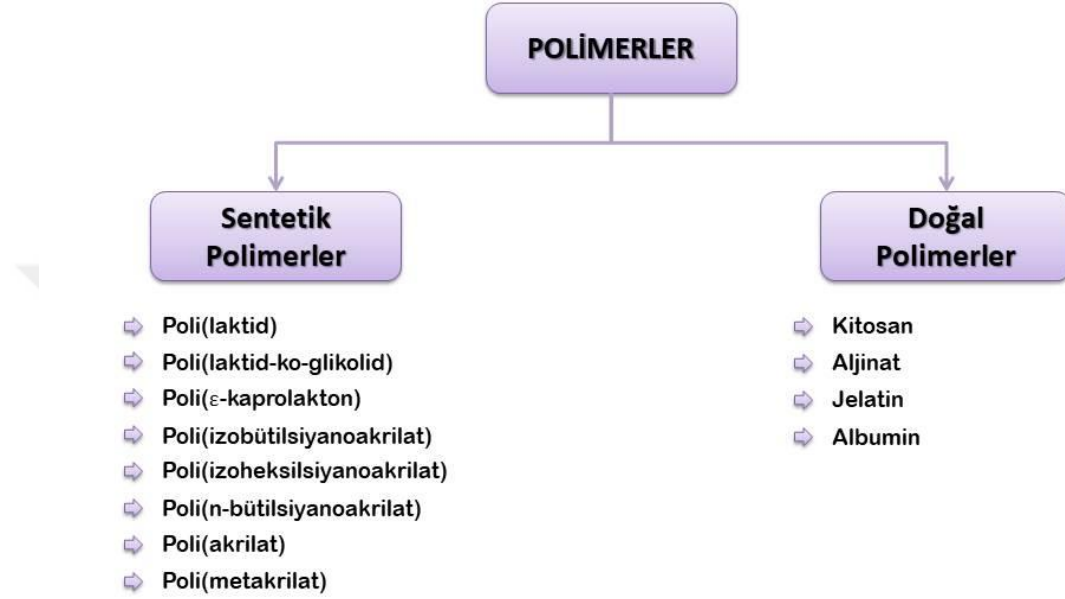


Şekil 2. 9 Polimerik nanopartiküller (Christoforidis, Chang, Jiang, Wang, & Cebulla, 2012)

Maddenin yüklü olduğu nanopartiküller sistemler ilk olarak vücuda alındığında kan dolaşımındaki hacim veya aktivitelerinin minimum kaybı ile tümör dokularına ulaşabilmeleri gerekmektedir. Akabinde kontrollü bir salım mekanizması ile normal hücreleri etkilemeden tümör hücrelerini öldürme yeteneğine sahip olması gerekmektedir. Dolayısıyla spesifik olmayan biyolojik dağılım, pasif veya aktif

hedefleme, suda çözünürlük eksikliği, zayıf biyoyararlanım gibi çeşitli sınırlamaları çözmek için karakterizasyon parametrelerine tabi tutulmaktadır (Bolhassani et al., 2014; Cho et al., 2008).

Polimerik nanopartiküller sentezlenmesi kolay ve ucuzdur. Bu partiküllerin hazırlanmasında doğal ve sentetik polimerler kullanılmaktadır (Şekil 2.10).

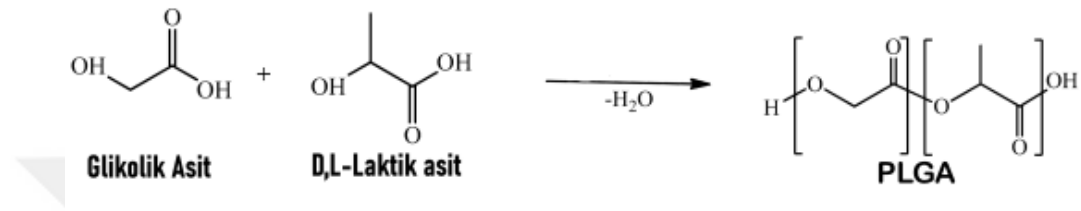


Şekil 2. 10 Polimer çeşitleri(Bolhassani et al., 2014; Derman et al., 2013)

Doğal polimerler, bitki veya hayvan bazlı kaynaklardan elde edilen yüksek biyoyumlu polimerlerdir. Bu polimer grubu yaygın olarak biyomedikal, doku mühendisliği, ilaç taşıma sistemlerinde kullanılsa da bir takım sınırlandırmaları mevcuttur. Bu sınırlandırmalar çok yönlü sentetik polimerlerin kıyasla daha çok tercih edilmesine yol açmaktadır. Sentetik polimerler, doğal polimerlere benzer mekanik özelliklere sahip olacak şekilde tasarlanabilmektedir. Bu özellikleri sayesinde doku veya hücre taklitçileri olarak kullanılabilir. Fakat bu grup polimerler, doğal polimerlere kıyasla yeterli biyoyumluluk göstermeyebilir. Bu nedenle, malzeme seçimi anahtar bir parametredir (Jarai, Kolewe, Stillman, Raman, & Fromen, 2020; Kamaly, Yameen, Wu, & Farokhzad, 2016).

Sentetik polimerler sınıfına ait PLGA (poly lactic-co-glycolic acid), Food and Drug Administration (FDA) ve European Medicine Agency (EMA) tarafından insanlarda ilaç dağıtım sistemlerinde kabul görmüş, yaygın olarak kullanılan başarılı biyopolimerlerdendir (Nimesh, 2013). Bu önemli kurumlar tarafından kabul görmesinin

yanı sıra biyouyumlu ve biyobozunur olması, uyarlanabilen biyodegradasyon oranı, iyi tanımlanmış formülasyonlar ve üretim yöntemlerine sahip olması, biyolojik malzemelerle daha iyi etkileşim sağlaması için yüzey özelliklerinin değiştirilme potansiyelleri ve pasif, aktif olarak hedeflenebilme kabiliyetleri nitelikleri arasında sayılabilmektedir. Şekil 2.11’de gösterildiği gibi PLGA’nın sentezi farklı oranlardaki laktik asit (LA) ve glikolik asit (GA) kopolimerizasyonu ile gerçekleşmektedir (Danhier et al., 2012; Gentile, Chiono, Carmagnola, & Hatton, 2014).



Şekil 2. 11 PLGA sentezi (Ayyoob & Kim, 2018)

LA ve GA monomerleri endojen olduğundan dolayı, PLGA Krebs döngüsü ile çıkarılan ester bağlarının hidrolizi sonucu vücut tarafından kolayca metabolize edilebilmektedir. Dolayısıyla LA, trikarboksilik asit döngüsüne girmekte CO₂ ve H₂O olarak vücuttan atılmaktadır. Benzer şekilde GA böbrekte değişmeden atılmakta veya trikarboksilik asit döngüsüne girmektedir. Buradaki LA ve GA oranları polimerin bozunma davranışını da etkilemektedir. GA oranı, polimerin bozunma hızını arttırdığını göstermektedir ve bu sebeple bu bilgi ilaç salınım hızını ayarlamada büyük önem kazanmaktadır. GA oldukça kristal bir yapıdadır. PLA polimeri ise, düzensiz polimer zincirlerinden dolayı oldukça kristal formda (PLLA) veya tamamen amorf formda (PDLA) olabilmektedir. Dolayısıyla bozunmayı etkileyen faktörler arasında PLLA ile kristal yapının artışı bozulma oranında azalma olduğunu ortaya koymuştur. pH etkisi, ilaç hidrofilik veya hidrofobikliği, yanı sıra molekül ağırlığının, yüzey alanının ve ilaç içeriğinin yüksek olması biyolojik ortamda bozunma hızını olumlu ve olumsuz olarak etkileyebilen ayarlanabilir bozunma faktörleridir (Makadia & Siegel, 2011; Nimesh, 2013).

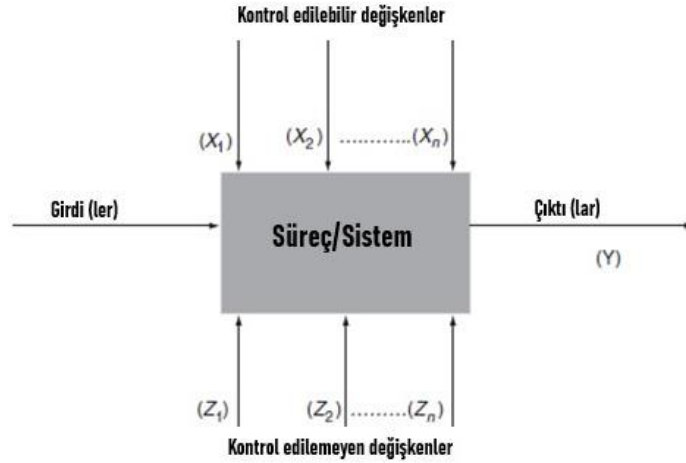
PLGA nanopartiküllerinin ilaç salınımını ve etkili yanıtın olabilmesi için PLGA yapısına ek olarak boyut, yüzey modifikasyonu ve hazırlanma yöntemi de önem kazanmaktadır. PLGA nanoparçacıklarının hazırlanmasında kullanılan en yaygın teknik, emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma tekniğidir. Bu yöntem tekli emülsiyon tekniği

(oil/water; O/W) ve çiftli emülsiyon tekniği (water/oil/water; W / O / W) olarak ikiye ayrılmaktadır. Hidrofilik ilaçların kapsüllenmesini sağlayan bu teknik, etken maddenin ve polimerin organik bir çözücü (örneğin, diklorometan; DCM, etil asetat) içerisinde çözülmesi ile yağ (oil; O) fazı oluşturulması ve uygun miktarlarda sürfaktan (örneğin, Poli-vinil alkol; PVA) içeren sulu bir fazda (water; W) emülsifiye edilmesine dayanmaktadır. Akabinde çözücü buharlaştırılarak örnek santrifüjlenmekte ve çöken nanopartiküller kurumaya bırakılmaktadır. Çiftli emülsiyon tekniğinde ise; tek fark suda çözünebilir etken maddenin su fazını (W) oluşturması ile başlamasıdır ve bu teknik tekli emülsiyon tekniğinin bir modifikasyonu olarak kabul edilmektedir (Danhier et al., 2012; Jarai et al., 2020).

Hazırlanan polimerik nanopartikül karakterizasyonu için çeşitli analizler yapılmaktadır. Bunlar arasında bu tez çalışmasında da kullanılan; fizyolojik ortamda bozunma hızı ve dolaşımında kalma gibi nitelikler kazandırmak amacıyla polimerik nanopartikülün boyutu belirlenmektedir. Diğer karakterizasyon çalışmaları ise; zeta potansiyeli, ultraviyole görünür spektrofotometresi, taramalı elektron mikroskobu ve atomik kuvvet mikroskobu görüntüleri, FT-IR gibi analizler yer almaktadır.

2.7 Deneysel Tasarım

Geleneksel olarak çeşitli deneylerde kullanılan monotetik analiz olarak bilinen OVAT (one variable at a time; her seferinde bir değişken) analizi bir faktör belirli aralıklarla değiştirilirken diğerlerinin sabit tutulmasına dayanan ve her bir faktörün denendiği bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımda çok sayıda deney yapılmasının yanı sıra değerlendirme çalışmalarında sınırlı kalmaktadır (Bowden, Pichler, & Maurer, 2019). Bu yaklaşıma alternatif olarak geliştirilen deneysel tasarım (Design of Experiments; DoE) çeşitli girdilerin yanıtlara dönüşmesini sağlamak ve değişkenler ile yanıt arasındaki etkileşimleri belirlemek için kullanılmaktadır (Şekil 2.12) (Antony, 2014). Deneysel tasarım sürecinde, öncelikli olarak değişkenler, sabitler ve yanıtlar belirlenmelidir. Parametre seçimleri genellikle ön deneylere ve literatür bilgisine dayanmaktadır (Yerlikaya et al., 2013).



Şekil 2. 12 Deneysel tasarım yönteminin işleyişi (Antony, 2014)

Deneysel tasarım, faktörlerin çıktı veya yanıtı etkisini belirlediği, optimize ürün eldesi sağladığı, daha az test sayısına rağmen daha çok veri analizi sayesinde zamandan ve bütçeden tasarruf ettirdiği ve kantitatif olarak modelleme sağladığı için OVAT yaklaşımına göre daha avantajlıdır (Brereton, 2003). Optimizasyon çalışması; çalışmanın amaçlarının tanımlanması, yanıtı etkileyen faktörlerin taranması, deneysel tasarım kullanılarak yanıt yüzeyi metodolojisi belirlenmesi, ilaç dağıtım sisteminin tasarıma göre formüle edilmesi ve değerlendirilmesi, istatistiksel analizin yapılması gibi adımları izlemektedir (Vardhan et al., 2017). Deneysel tasarım Şekil 2.13'teki gibi iki sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar: screening design (eleme/tarama tasarımı) ve optimizing desing (optimizasyon tasarımı).



Şekil 2. 13 Deneysel tasarım yönteminin çeşitleri

2.7.1. Plackett-Burman Deneysel Tasarım Metodu

Bu tasarım 1946 yılında Robin L. Plackett ve J. P. Burman tarafından geliştirilen bir tasarım yöntemidir. Çok sayıda değişkeni minimum deneme sayısı ile tarama ve eleme

imkanı sunmaktadır. Bir başka deyişle amaç yanıtla ilgili değişkenleri tespit etmektir. Plackett-Burman deneysel tasarımı en yaygın kullanılan eleme tasarımıdır. Bu tasarımda N deney sayısı olarak ifade edilir ve bu sayı 4'ün katları olmalıdır. L seviyeyi göstermektedir. Plackett-Burman deneysel tasarım metodu iki seviyeli (1,-1) tasarımlardır. Buna göre Eşitlik (2.1) kullanılarak parametre sayısı belirlenmektedir (Fukuda, Pinto, Moreira, Saviano, & Lourenço, 2018; No & Committee, 2013).

$$k = \frac{N-1}{L-1} \quad (2.1)$$

İlk veya son satırlardaki tüm faktörler sabit tutularak matriks çizilmelidir (Şekil 2.14) İkinci satır generator (jeneratör) olarak adlandırılmaktadır ve farklı sayıda farklı jeneratörler mevcuttur (Şekil 2.15). Matriks, ilk satır hariç sütunlar aşağı bir satır kaydırılarak oluşturulur (Brereton, 2003; Leardi, 2013).

		FAKTÖRLER										
		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
D E N E Y L E R	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
	3	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
	4	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
	5	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
	6	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
	7	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
	8	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	9	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
	10	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
	11	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
	12	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+

Şekil 2. 14 Deneysel tasarımda kullanılan matriks örneği (Brereton, 2003)

N=8	+ - - + - + +
N=12	+ + - + + - - - + -
N=16	+ + + + - + - + + - - - -
N=20	+ + - - + + + - + - - - - + + -
N=24	+ + + + + - + - + - - + + - - - - -

Şekil 2. 15 Deneysel tasarımda kullanılan jeneratörler (Leardi, 2013)

Oluşturulan deney tasarımlarına verilen yanıtların incelenmesi sonucu değişkenlerin etkileri hakkında yorumlar geliştirilmektedir.

2.7.2. Box-Behnken Deneysel Tasarım Metodu

Her faktör için üç seviye gerekir (-1,0,1) ve cevap yüzey deneysel tasarım metodolojileri arasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Vardhan et al., 2017). Genellikle Plackett-Burman gibi ön tarama tasarımlarının akabinde en etkili faktörler

seçildikten sonra optimize etmek için tercih edilmektedir (A. De, Kuppuswamy, & Jaiswal, 2019). Optimizasyon tasarımları, her bir faktörün üçüncü dereceden cevap yüzey modellemesine olanak sağlamaktadır (Fukuda et al., 2018).



3.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler

- ApopTag Plus Peroxidase In Situ Cat. No. S7101
- Bakır (II) Klorür- Sigma-Aldrich
- Bovin Serum Albümin
- Diklorometan (DCM) – Merck
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) – ChemCruz
- Disodyum Fosfat Dihidrat – Sigma Aldrich
- Dulbecco's Medified Eagle Medium / F-12 Nutrient Mix (Ham)- Sigma Aldrich
- EDTA-disodyum
- Etil Alkol – Merck
- Fetal Bovin Serum – Gibco
- Hematoksilen Boya- Sigma Aldrich
- Hidrojen peroksit- Sigma Aldrich
- Hidroklorik Asit- Sigma Aldrich
- Invitrogen AEC Substrate Kit
- Invitrogen Histostain Plus Cat. No. 85-9043
- İmersiyon Yağı – Olympus
- Kapatma Medyumu – Lab Vision
- Ksantin – Sigma Aldrich
- Ksantin Oksidaz- Sigma Aldrich
- L-Glutamine 200 mM (100x) – Gibco
- MEBM Mammary Epithelial Cell Growth Basal Medium-LONZA
- MEGM™ Mammary Epithelial Cell Growth Medium SingleQuots™ Kit-LONZA
- Metafosforik asit- Sigma Aldrich
- Metanol- Merck
- Monosodyum Fosfat – Sigma Aldrich
- Nitroblue Tetrazolium- Sigma Aldrich
- PCNA Antikor – Santa Cruz
- Penisilin - Streptomisin (PEST) – Sigma Aldrich
- Poli(laktik-ko-glikolik asit) PLGA – Sigma Aldrich

- Polivinil Alkol – Sigma Aldrich
- Sinapik Asit – Sigma Aldrich
- SMART™ BCA Protein Assay Kiti
- Sodyum Hidroksit – Sigma Aldrich
- Sodyum Karbonat- Sigma Aldrich
- Sodyum Klorür – Sigma Aldrich
- Sodyum Monohidrojen Fosfat- Sigma Aldrich
- Sodyum sitrat- Sigma Aldrich
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide – Sigma Aldrich
- Tiyobarbütirik asit- Sigma Aldrich
- Trikloroasetik asit- Sigma Aldrich
- Tripan Mavisi – Sigma Aldrich
- Tripsin EDTA – Multicell

3.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

- -80°C Dondurucu - Thermo Scientific
- Buzdolabı-Bosch
- CO₂ inkübatör – N- Biotek Nb-203 XL
- Çoklu Kanallı Manuel Otomatik Pipet – Thermolab
- Çoklu Manyetik Karıştırıcı- IKA
- ELISA Okuyucu – BioTek Powerwave XS2
- FT-IR Thermo Scientific Nicolet iS10
- Hassas Terazi – Shimadzu
- Işık Mikroskobu
- Karıştırıcılı Isıtıcı – Isolab
- Laminar Kabin – Hedlab X-Bio Class-II
- Liyofilizatör – Telstar Cryodos
- Mini Santrifüj Cihazı – Hermle Z 206 A
- Otoklav- Hermle
- Peristaltik Pompa – Masterflex Core Palmer
- pH Metre – Hanna
- Pipet 0,2- 2 µl – Thermo Lab
- Pipet 100 – 1000 µl – Thermo Lab

- Pipet 10-100 µl – Rainin
- Pipet 20 – 200 µl – Rainin
- Pipet 2-20 µl – Rainin
- Saf Su Cihazı – Sartorius Arium Pro
- Santrifüj Cihazı – Beckman Coulter Allegra X-30 R
- Sıvı Azot Tankı – International Cryogenics, Inc. 20R
- Sonikatör – Bandelin Sonoplus
- Taramalı Elektron Mikroskobu – ZEISS EVO LS10
- Ters Floresan Mikroskop – ZEISS AxioVert01
- Ultrasonik Su Banyosu – Bandelin Sonorex
- UV-Vis Spektrofotometre – Shimadzu UV-1800
- Vorteks – Velp
- Zeta Sizer – Malvern ZEN 3600 Nano iS10

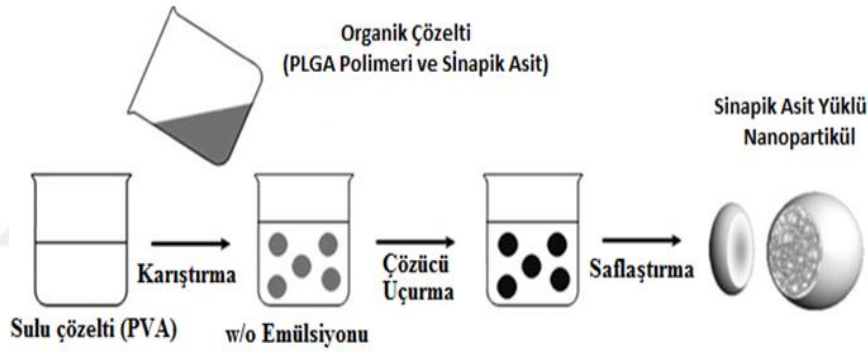
3.3 Tez Çalışmasında Kullanılan Sarf Malzemeler

- 6, 24 ve 96 Kuyucuklu Plate-NEST
- Beher-ISOLAB
- Flask 25 ve 75 cc'lik-NEST
- İnce Uçlu pense
- Kriyotüp-ISOLAB
- Lam-Lamel-ISOLAB
- Parafilm-Bemis
- Serolojik Pipetler-SPL Life Sciences
- Steril Falkonlar-ISOLAB
- Steril Şırınga
- Şişeler-Schott DURAN
- Thoma Lamı-Isolab
- Yuvarlak Lamel- Marienfeld

3.4 Sinapik Asit Yüklü Nanopartikül Sentezi

Sinapik asit yüklü PLGA nanopartikül (SaNP) sentezi tekli emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile Şekil 3.1'deki işlem basamakları takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Organik faz eldesi için PLGA molekülü organik bir çözücü olan 0,5 ml diklorometan

(DCM) içinde, sinapik asit molekülü ise 1 ml etil alkol, 1 ml DCM içerisinde çözüldükten sonra her iki çözelti birbirine karıştırılmıştır. Hazırlanan organik faz polivinilalkol (PVA) çözeltisi üzerine peristaltik pompa kullanılarak farklı akış hızlarında damla damla eklenmiştir. PVA deneysel tasarım metodu için farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Organik fazın sulu faz içine iyice dağılması ve bunun sonucunda tekli emülsiyon eldesi için karışım buz banyosunda sonikasyona tabi tutulmuştur. Sonikasyon sonrası oluşan karışım seyreltik PVA çözeltisi (%0,1) üzerine peristaltik pompa yardımıyla eklenmiş ve sonrasında organik çözücülerin uçurulması için oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Örnekler santrifüj edildikten sonra ve birkaç defa ultra saf su ile yıkanmış ve üst faz sinapik asit analizi için toplanmış, elde edilen nanopartiküller ise liyofilizatörde (-70 °C, 0,01 mbar basınçta) gece boyunca kurutulmuştur. Kuru olarak elde edilen nanopartiküller analiz edilmek üzere -20 °C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3. 1 Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile SaNP üretilmesi

Nanopartikül içerisine yüklenen etken madde miktarını saptamak için nanopartikülün santrifüj sonrası elde edilen üst fazları kullanılmıştır. İlk santrifüj sonrası ve yıkama sonrası elde edilen üst fazlar toplanmış, 306 nm’deki absorbans değeri okunmuş ve okunan absorbans değerleri kullanılarak üst fazdaki Sa miktarı hesaplanmıştır. Üst fazdaki Sa miktarı önceden hazırlanan kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplanmıştır. Üst fazdaki Sa miktarı ve başlangıçtaki Sa miktarı Eşitlik (3.1)’de yerine konularak Sa için enkapsülasyon etkinliği indirekt yöntem ile saptanmıştır. Sa yükleme verimi (DL) ise nanopartikül içerisindeki Sa miktarı ve katı olarak elde edilen nanopartikül miktarı kullanılarak Eşitlik (3.2) yardımı ile hesaplanmıştır. Üretilen nanopartiküllere ait reaksiyon verimi (RV) ise Eşitlik (3.3) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$EE(\%) = \frac{\text{Nanopartikül içindeki sinapik asit miktarı (mg)}}{\text{Kullanılan sinapik asit miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$DL(\%) = \frac{\text{Nanopartikül içindeki sinapik asit miktarı (mg)}}{\text{Elde edilen nanopartikül miktarı (mg)}} \times 10 \quad (3.2)$$

$$RV(\%) = \frac{\text{Elde edilen nanopartikül miktarı (mg)}}{\text{Nanopartikül sentezinde kullanılan PLGA+Sinapik asit miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.4.1. Optimize Nanopartikül Sentezi

Plackett Burman ve Box Behnken deneysel tasarım metodlarını takiben programın bir çıktısı olarak minimum boyutlarda, enkapsülasyon etkinliğini maksimize eden optimum parametreler ile nanopartikül elde edilmiştir. Optimize nanopartikül eldesi için 80 mg Sinapik Asit 1ml etil alkol, 1 ml DCM içerisinde ve deneysel tasarım çıktısı olarak belirlenen 116,73 mg PLGA ise 0,5 ml DCM ile çözülmüştür. Daha sonra iki çözelti karıştırılmış ve deneysel tasarım metodu optimum noktası olarak değerlendirilen ikinci parametre olan sonikasyon gücü %96,72' ye ayarlanarak 5 ml PVA çözeltisi (% 1,5) üzerine peristaltik pompa yardımıyla sabit akış hızında (akış hızı 1: 5 ml/dk) eklenmiştir. Karışım sonikatör cihazı ile ve 90 sn süre ile sonike edilerek emülsiyon elde edilmiştir. Bu emülsiyon daha sonra manyetik karıştırıcıda karıştırılmakta olan 35 ml % 0,1 PVA çözeltisi içine peristaltik pompa ile sabit akış hızında (akış hızı 2: 2 ml/dk) eklenmiştir. Nanopartikül çözeltisi, enkapsülasyon etkinliğini ve boyutunu etkileyen parametrelerden biri olan manyetik karıştırıcıda hızı 995,62 rpm olacak şekilde 3 saat boyunca karışması sonucu organik çözücünün buharlaşması sağlanmıştır. Nanopartikülleri çöktürmek için 9000 rpm'de 40 dk santrifüj işlemi uygulanmış ve çöktürme sonrası elde edilen nanopartiküllerin dış yüzeyinde bulunan surfaktan (PVA) kalıntılarını uzaklaştırmak için 35 ml saf su ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği ile ilaç yükleme miktarı hesaplanmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.5 Sinapik Asit Yüklü Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

Her sentezlenen polimerik nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyel analizleri 4,0 mV He-Ne lazer lamba (633 nm) ile donatılmış Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments,

UK) cihazında, Dinamik Işık Saçılması Yöntemiyle 25 °C'de $\pm 0,1$ °C hassasiyet ile 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

FT-IR analizi ise; Thermo Scientific Nicolet iS10 cihazı kullanılarak 3 tekrarlı olarak analiz edilmiştir.

Morfolojik incelemeler, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) tarafından gerçekleştirilmiştir. SEM analizi; iletkenliği bulunmayan polimerik nanopartiküllere altın ile kaplama işlemi yapılarak 10 kV altında 60.000X büyütme oranı ile Carl-Zeiss EVO LS10 cihazında, TEM analizi ise; temassız analiz yöntemi ile Shimadzu Scanning Probe Microscope-SPM 9600 cihazında yapılmıştır.

3.6 In vitro Salım Çalışması

Öncelikle PBS tamponu hazırlanmıştır. Bunun için 0,24g monosodyum fosfat, 0,36g sodyum monohidrojen fosfat ve 0,12 g sodyum klorür tartılmış, üzerine 200 ml su eklenerek manyetik karıştırıcıda homojen olması sağlanmış ve pH'ı 7.4 olarak ayarlanmıştır. *In vitro* salımı inceleyebilmek için optimize nanopartikülleri hazırlanan fosfat tamponu içerisinde 37 °C' de, yatay olarak çalkalamaya (200 rpm) bırakılarak günlük salım izlenmiştir. +4 °C'de 10000 rpm'de, 20dk olacak şekilde santrifüj edilerek üst fazları toplanmıştır. 306 nm'de daha önce çizilen sinapik asit standart eğrisi yardımıyla sinapik asit miktarı hesaplanmış ve 60 gün boyunca takip edilmiştir.

3.7 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında MCF-7 ve MCF10A hücre hatları kullanılmıştır. MCF-7 hücre hattı, Michigan Cancer Foundation (Michigan Kanseri Vakfı; MCF) tarafından desteklenmesine ve izole eden araştırmacının bir kanser hücre hattı oluşturmaya yönelik yedinci girişimine istinaden bu adı almıştır (A. V. Lee, Oesterreich, & Davidson, 2015). 60'lı yaşların sonlarında invaziv karsinomu olan bir kadının plörezisinden izole edilen bu meme kanseri hücre hattı (Soule, Vazquez, Long, Albert, & Brennan, 1973), östrojen reseptörünü eksprese etme ve stabiliteğini korudukları için araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Hathout, Gehrman, Chertov, & Fenselau, 2004).

MCF10A hücreleri ise, neoplastik olmayan insan meme epitelyal hücrelerinin modifiye edilmiş halidir. Diploit karyotipe sahip bu hücre hattı, ölümsüz olmaları ve kültüre

edilmeleri nedeniyle *in vitro* deneysel çalışmalarda tercih edilmektedir (Imbalzano, Tatarkova, Imbalzano, & Nickerson, 2009).

Sıvı azotta dondurularak muhafaza edilen MCF-7 ve MCF10A hücre hatları, sıvı azot tankından çıkarılarak 25 °C'deki steril su içerisinde çözülmüş ve akabinde 15 ml MCF-7 hücre hattı için DMEM+F12, L-glutamin, Penisilin-Streptomisin ve %10 FBS içeren, MCF10A hücre hattı için MEMB, Lonza kiti, L-glutamin, Penisilin-Streptomisin ve %10 FBS içeren falkon içerisine ve hızlı bir şekilde alınmıştır. Falkon içerisindeki hücreler 5 dk boyunca 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak kalan pellet üzerine her bir hücre hattı için uygun tamamlanmış besiyerleri eklenerek hücrelerin homojen dağılması için yavaşça ve dikkatli şekilde pipetaj yapılmıştır. Hücrenin yoğunluğuna bağlı olarak uygun santimetre küplük flask içerisine hücreler ekilmiştir. Flask içerisine ekilen hücrelerin inkübasyonu 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde gerçekleşmiştir. Mikroskopta incelenen hücreler flask yüzeyini %80 oranında kapladığı esnada pasajlama işlemi yapılmıştır.

Pasajlama işleminin ilk basamağında flaskı ölü hücrelerden ve tamamlanmış besiyerinden uzaklaştırmak için PBS (7,4 pH) ile yıkama yapılmıştır. Flask yüzeyine yapışan hücrelere tripsin-EDTA ile muamele edilerek birkaç dakika boyunca inkübatöre bırakılmıştır. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları mikroskop altında incelenerek tespit edildikten sonra yaklaşık 15 ml kadar tamamlanmış besiyeri içeren steril falkon içerisine aktarılmış 5 dk boyunca 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletlerin üzerine tamamlanmış besiyeri eklenip yavaşça pipetaj yapıldıktan sonra hücreler, iki yeni flaska taze tamamlanmış besiyeri eklenerek eşit olarak bölüştürülmüştür. Flaska ekilen hücrelerin inkübasyonu aynı koşullar altında gerçekleşmiştir.

Deneylerde pasajlanan hücreler kullanıldıktan sonra kalan hücreler hazırlanan dondurma solüsyonu ile başka deneylerde kullanılmak üzere dondurulmuştur. Dondurma solüsyonunu (freezing medium) hazırlamak için DMSO ve FBS 1:9 oranında steril bir falkon içerisine eklenir. Hazırlanan bu solüsyon hücrelere tripsin eklenip kaldırılıp, santrifüj (5dk,1000rpm) sonrası süpernatantı atılan falkon içerisinde kalan hücrelere eklenmiş ve hücreler 10⁶ hücre/ml olacak şekilde kriyotüplere aktarılmıştır. Kriyotüpler kademeli olarak soğutması için kriyo soğutma kabı içerisine alınarak -80 °C

olan dondurucuya atılmış ve bir gün boyunca bekletilmiştir. Takip eden günde -80 °C'den alınarak kriyo tüpler sıvı azot tankına geçirilmiştir.

3.7.1. MTT Yöntemi

Optimize Sa yüklü nanopartiküllerin insan meme kanseri MCF-7 ve tumoriyenik olmayan insan meme epitelyal MCF10A hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntem Mosmann tarafından tanımlanmış, Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Mitokondriyal dehidrogenaz enzimi sarı renkli, suda çözünebilir bir tuz olan MTT tuzunu, suda çözünmeyen formazana indirgeyerek mor renkli kristaller ortaya çıkarmaktadır. Dimetil sülfoksit (DMSO) ile muamelesi sonucu çözülen formazan kristalleri canlılığın ölçütü olarak kantitatif olarak ELISA okuyucuda kalorimetrik yöntemle hesaplanabilmektedir (Razavi, 2017).

Bu tez çalışmasında pasajlanarak elde edilen yeterli sayıda MCF-7 ve MC10A hücrelerinin her biri ayrı ayrı işlem görmüş ve her iki hücre hattı için de aynı adımlar izlenmiştir. Öncelikli olarak hücreler PBS ile yıkanmış, tripsin-EDTA ile kaldırılmış akabinde santrifüj edilerek bir falkon içerisinde pellet şeklinde elde edilmiştir. Pellet çok az bir miktar besiyeri ile çözülerek 1:1 oranında hücre süspansiyonu ve tripan mavisi alınarak thoma lamına aktarılmış ve sonrasında mikroskop altında sayımı yapılmıştır. Hücreler sayım sonrası hesaplanan miktar besiyeri içerisinde yavaşça pipetaj yapılarak homojen dağılması sağlanmış ve 96 kuyulu mikropiplakların her bir kuyucuğuna 10^4 hücre/ml'de olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat boyunca inkübasyona (%5 CO₂, 37 °C) bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası toksik etkileri incelenecek olan Sa ve optimize SaNP formülasyonları 50-100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında süspanse edilerek kuyucuklara eklenmiştir. Mikropiplaklar 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi dolan hücreler faz kontrast mikroskopta incelenerek meydana gelen değişiklikler tespit edilmiş ve kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır. İncelenen hücrelerin besiyerleri çekilerek, üzerine MTT solüsyonundan 50 µl eklenmiştir. 3 saat inkübe işlemi sonrasında kuyucuklardan MTT boyası çekilerek 100 µl DMSO eklenmiştir. Mikropiplaklar ELISA ile 570 nm'de okutularak sonuçlar hesaplanmıştır. Deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Alınan ölçümlerin her bir konsantrasyon grubu için % olarak canlılık oranı Eşitlik (3.4) kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplama sonucunda hücrelerin IC₅₀ değerleri belirlenmiştir.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{OD570}(\text{örnek})}{\text{OD570}(\text{kontrol})} \times 100 \quad (3.4)$$

3.7.2. Hücre Proliferasyon Testi

Optimize edilen nanopartiküllerin MCF-7 ve MCF10A hücrelerindeki proliferasyonu immünositokimyasal olarak Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) antikoru kullanılarak çalışılmıştır. Üç özdeş polipeptit üniteden oluşan 36 kDa'lık bir protein olan PCNA'nın okazaki fragmanı işlemede, DNA replikasyonunda, onarılmasında, hasar toleransında ve hücre döngüsünün kontrolünde görev aldığı bilinmektedir. Böylece memeli hücrelerinde PCNA, çeşitli reaksiyonların kontrolünde kilit bir rol oynadığı görünmektedir (Boehm et al., 2016; Kitamoto et al., 1993; Maga & Hübscher, 2003). PCNA ekspresyonu, interfazın G₁/S evrelerinde maksimum seviyesine ulaşır, mitoz sırasında ise düşüş göstermektedir. Bu nedenle, PCNA, hücre döngüsünün G₁ / S fazları için endojen bir histolojik marker olarak görev yapar. PCNA ekspresyonu ile mitotik aktivite ve tümör arasında bir ilişki olduğunu çalışmalar göstermektedir. Bu sebeple hücredeki proliferasyon düzeyi bu yöntemle belirlenmektedir (Kitamoto et al., 1993; Kubben et al., 1994).

Bu tez çalışmasında pasajlanarak elde edilen yeterli sayıda MCF-7 ve MC10A hücrenin her biri ayrı ayrı işlem görmüş ve her iki hücre hattı için de aynı adımlar izlenmiştir. Uygulamadan önce yuvarlak lameller steril edilmiş ve 24 kuyucuklu plate içerisine yerleştirilmiştir. Her yuvarlak lamelin üzerine 10⁴ hücre/ml olacak şekilde MCF-7 ve MCF10A hücreleri ekilmiş ve bir gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (100-150-200 µg/ml) Sa ve SaNP, ekilen hücrelere verilmiştir. Uygulanan dozların ardından hücreler 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi dolduğunda hücre, besiyerini uzaklaştırmak amacıyla PBS ile yıkanmış ve ardından -20°C'deki metanol ile fikse edilmiştir. Invitrogen histostain plus kiti kullanılarak prosedür örneklere uygulanmıştır. Tüm işlemler yatay çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her bir örneğe kit içerisinde bulunan serum blocking solüsyonundan (A solüsyonu) 6 damla eklenerek 20 dakika boyunca oda ısısında inkübe edilmiştir. 1:300 oranında PBS ve PCNA antikoru eklenerek bir gece boyunca +4°C'de

inkübasyona bırakılmış ve bir günlük inkübasyonun ardından örnekler 5 dk boyunca 3 tekrarlı olacak şekilde yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından sekonder antikor (B antikoru) eklenerek 20 dk boyunca oda ısısında inkübasyona bırakılan örnekler PBS ile 5 dk, 3 tekrarlı olarak yıkanmış, ardından Streptavidin-peroxidase (C solüsyonu; HRP) eklenerek 20 dk boyunca oda ısısında tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası PBS ile üç tekrarlı yıkama aşaması tekrarlanmış, ardından spesifik renk reaksiyonu için hücelere AEC kromojen kiti ve hematoksilin ile zıt boyama yapılmıştır. Boyanan hücreler yuvarlak lamellerle birlikte kapatma medyumunu damlatılmış bir lam üzerine alınarak ışık mikroskopunda 10 farklı alandaki boyanan hücreler sayılmıştır. Hücre proliferasyonu Eşitlik (3.5)'e göre hesaplanmıştır.

$$Proliferasyon\ Yüzdesi\ (\%) = \frac{\text{işaretlenen hücreler}}{\text{işaretlenen} + \text{işaretlenmeyen hücreler}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.7.3. TUNEL Testi

Optimize edilen nanopartiküllerin MCF-7 ve MCF10A hücrelerindeki apoptotik etkileri TUNEL(Terminal Deoksinükleotidil Transferaz aracılı dUTP-Biotin Nick Uç-Etiketleme) yöntemi kullanılarak çalışılmıştır. Bu yöntem hücre yaşam döngüsünde önemli bir yere sahip olan apoptozun tespitini mikroskop veya sitometri ile yapılan incelemeler sonucu DNA kırıklarının tespitine dayanmaktadır. Apoptotik hücrelerde kesilen DNA zincirinin 3'OH-ucu serbestleşir, primer olarak işlev görür. Serbestleşen bu uç eksojen terminal deoksinükleotit transferaz (TdT) tarafından etiketlenir (Darzynkiewicz, Galkowski, & Zhao, 2008). Akabinde, Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) bu uca bağlanarak, 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB) varlığında substrat olarak kullanılır ve böylelikle DNA kırıkları işaretlenmiş, apoptotik hücreler de belirginleşirmiş olur (Fiskum, 1996).

Bu tez çalışmasında pasajlanarak elde edilen yeterli sayıda MCF-7 ve MC10A hücrenin her biri ayrı ayrı işlem görmüş ve her iki hücre hattı için de aynı adımlar izlenmiştir. Uygulamadan önce yuvarlak lameller steril edilerek 24 kuyucuklu plate içerisine yerleştirilmiş, her yuvarlak lamelin üzerine 10^4 hücre/ml olacak şekilde MCF-7 ve MCF10A hücreleri ekilmiş ve bir gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (100-150-200 $\mu\text{g/ml}$) Sa ve SaNP ekilen hücelere verilmiştir. Hücreler 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi dolduğunda hücre,

besiyerini uzaklaştırmak amacıyla PBS ile yıkanarak -20°C'deki metanol ile fikse edilmiştir. Bir lam üzerine yuvarlak lameller hücreler işlem görecektir şekilde yerleştirilmiştir. PBS ile muamele sonrası Apoptaq Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kiti (Cat. No. S7101) örneklere uygulanmıştır. Bunun için her bir örneğe kit içerisinde bulunan Equilibration tamponundan 50 µl olacak şekilde eklenmiş ve 2 dakika bekletilmiştir. Sonrasında her bir örneğe 70 µl reaksiyon tamponu ve 30 µl TdT enzimi eklenerek 37 °C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. 1 saatin sonunda 10 dk boyunca durdurma solüsyonu (Stop/wash) ile muamele edilen hücrelere daha sonra PBS ile 1 dk boyunca 3 tekrarlı yıkama yapılmıştır. Akabinde, 50 µl Anti-digoxenin peroksidaz eklenerek 30 dk oda ısısında bekletilmiştir. 2 dk boyunca PBS ile 4 tekrarlı yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası 98 µl DAB dilüsyon buffer üzerine 2µl DAB eklenerek substrat hazırlanmış ve spesifik renk reaksiyonu için her bir örneğe uygulanmıştır. Zıt boyama için örneklere hematoksilin ile muamele edilmiş, hücreler kapatma mediumu ile kapatılarak ışık mikroskopunda 10 farklı alanda işaretlenen hücreler sayılmıştır. Apoptoz yüzdesi Eşitlik (3.6)'daki denklem ile hesaplanmıştır.

$$\text{Apoptoz Yüzdesi (\%)} = \frac{\text{işaretlenen hücreler}}{\text{işaretlenen+işaretlenmeyen hücreler}} \times 100 \quad (3.6)$$

3.8 Oksidatif Stres ve Antioksidan Çalışmaları

Total protein hesaplamak, akabinde MDA düzeyi ile oksidatif stresi belirlemek ve antioksidan deneyleri SOD, GSH, Katalaz aktivitelerini ölçmek için öncelikle MCF-7 hücre lizatları hazırlanmıştır.

3.8.1. MCF-7 Hücre Lizatlarının Hazırlanması

25 cm²'lik flasklarda kültüre edilen hücrelere 24. ve 48. saatler için 100-150-200 µg/ml Sa ve SaNP uygulanmış, her bir grubun kontrol hücreleri de ayrı olarak kültüre edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücrelerin besiyerleri toplanarak hücrelere Tripsin-EDTA eklenmiş ve hücrelerin kalkması sağlanmıştır. Kalkan hücreler 5 ml PBS içerisine alınarak 5 dk 1000 rpm'de santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası üst fazlar toplanarak pellet 1 ml PBS içerisine alınıp -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.8.2. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini SMART™ BCA Protein Assay Kiti kullanılarak tespit edilmiştir. Öncelikle kit içerisinde bulunan BSA çözeltisi kullanılarak protein standart eğrisi

hazırlanmıştır. Ardından örnekler analiz edilmiş, her bir numuneden 25 µl alınarak 96 kuyucuklu planelere sırasıyla eklenmiştir. Örneklerin üzerine kit içerisinde bulunan A ve B çözeltilerinin 50:1 oranında karıştırılması ile hazırlanan çözeltiden 200 µl eklenerek 30 saniye boyunca çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Plate 37°C’de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonrasında plate oda sıcaklığında soğutularak 562 nm’ deki absorbans değerleri ELISA okuyucuda okunarak belirlenmiştir. Protein miktarları BSA ile hazırlanan standart eğri dikkate alınarak hesaplanmıştır.

3.8.3. MDA Düzeyinin Belirlenmesi

Lipit peroksidasyonu tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyon veren bileşiklerin (TBARS, “thiobarbituric acid reactive substances”) belirlenmesine dayanan spektrofotometrik bir yöntemle ölçülmüştür (Aust, 1994). Malondialdehit (MDA); hücre zarı üzerinde gerçekleşen, serbest radikallerin saldırdığı lipit peroksidasyon ürünlerinden biridir ve hücre hasarının dolaylı olarak ölçülmesini sağlar. Tümörjenezin en önemli unsurlarından biri olan MDA, hücre zarı yapısını tahrip edebilir, DNA parçalanmasına, yeniden düzenlenmesine, çapraz bağlanmasına neden olabilir ve apoptozu hızlandırabilir (Wen et al., 2013).

Lipit peroksidasyon son ürünü olan malondialdehit tayini yapılırken ; %15’lik Trikloroasetik Asit ve %3,75’lik Tiyobarbitürik Asit kullanılarak TCA/TBA reaktifi hazırlanmış, 0,1 ml hücre lizatı üzerine 0,2 ml reaktif eklenerek 15 dk 100 °C’de kaynatılmıştır. 3000 g’de 5 dk santrifüj edilen örneklerle 532 nm’de okuma yapılmıştır. Örneklerin TBARS içeriği belirli miktarlarda (0,82; 1,23; 1,64; 2,46; 3,28 µg) malondialdehit (MDA, 1,1,3,3-tetrametoksipropan) içeren çözeltilerin deney sonundaki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

3.8.4. SOD Enziminin Aktivitesinin Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümünde, spektrofotometrik olarak Sun’un yöntemi kullanılmıştır (Sun, Oberley, & Li, 1988). SOD; serbest radikaller ve oksidatif strese karşı ilk savunmayı gerçekleştirir. Memelilerde sitoplazmik Cu / ZnSOD (SOD1), mitokondriyal MnSOD (SOD2) ve hücre dışı SOD (ECSOD, SOD3) olmak üzere üç izoformu bulunur (Zalewska-Ziob et al., 2019). Biyokimyasal yöntemde, ksantin-ksantin oksidaz, O₂^{·-} oluşturmak için kullanılır ve nitroblue tetrazolium (NBT) azalması, O₂ üretiminin bir göstergesi olarak kullanılır. SOD, O₂^{·-} için NBT ile rekabet eder ve

dolayısıyla NBT azalmasının yüzde inhibisyonu, mevcut SOD miktarının ölçüsünü verir (Weydert & Cullen, 2010). Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi iki aşamalı kimyasal bir reaksiyon ile gerçekleşir. Bu reaksiyon, süperoksit dismutaz enziminin prostetik grubu ile süper oksit anyonu bir proton edinen ve moleküler oksijeni serbestleştiren süperoksit anyonuna bağlanan enzimin (Fe^{2+} , Cu^{+} ve Mn^{2+}) okside olması ile başlar. Enzimin indirgenmiş formu H_2O_2 'yi serbest bırakmak ve oksitlenmiş formuna geri dönmek için ikinci süperoksit anyonu ve protonu bağlar. Metal iyon merkezi daha negatif yüklü olmasına rağmen, ikinci süperoksit anyonunun bağlanması nötr pH'a sahip ortamda aynı alanda toplam yük ile mümkündür. Böylece süperoksit anyonunun hidrojen peroksite dönüşümü katalize edilir (Johnson et al., 2008).

MCF-7 hücre kültür ortamından her bir örnek üzerine 0,3 mM Ksantin, 0,6 mM EDTA-disodyum, 150 μ g/mL NBT, 400 mM Na_2CO_3 ve 1 mg/ml BSA gerekli oranlarda kullanılarak reaktif çözeltisi hazırlanmış, daha sonra her bir örnek için 500 μ l lizat üzerine 2,45 ml reaktif karışımı ve 50 μ l ksantin oksidaz eklenmiştir. Tüpler $25^{\circ}C$ 'de 20 dakika inkübe edildikten sonra her bir tüpe 1 ml $CuCl_2$ eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve 560 nm'de distile suya karşı absorbanans ölçümü yapılmıştır. Eşitlik (3.7) ve (3.8)'de SOD aktivitesine ait % inhibisyon değerleri ve spesifik aktivite tayini hesaplama yöntemleri verilmiştir.

$$\text{Yüzde İnhibisyonu} = \frac{\text{Körün absorbanansı} - \text{Testin absorbanansı}}{\text{Körün absorbanansı}} \times 100 \quad (3.7)$$

$$\text{Spesifik aktivite (SA)} = \frac{\text{Körün absorbanansı} - \text{Testin absorbanansı}}{\text{Körün absorbanansı}} \times 20 \quad (3.8)$$

Hesaplama yaparken 1 ünitelik aktivitenin %50 inhibisyon yaptığı düşünülmüş, aktivite BCA yöntemiyle elde edilen proteine göre ünite/mg protein olarak hesaplanmıştır.

3.8.5. Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi

Glutasyon; glisin, sistein ve glutamik asit olmak üzere üç aminoasitten oluşan, düşük molekül ağırlıklı bir bileşiktir. İnsan vücudunda bulunan glutasyon formları; en sık rastlanılan indirgenmiş glutasyon (GSH) ve oksitlenmiş glutasyon (GSSG) şeklindedir (Mirończuk-Chodakowska, Witkowska, & Zujko, 2018). GSH'nin önemi normal koşullar altında hücrel redoks ortamında ve stresin başlangıcında görev almasıdır.

GSH, stresin sinyallemesi için temel sağlar. Redoks düzenlemesine ek olarak tiyol (SH) grubu nedeniyle de hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol almaktadır (Blokhina, Virolainen, & Fagerstedt, 2003). Glutasyon; peroksidaz sırasında oluşan okside glutasyonu, redükte glutatyonu dönüştürerek dolaylı olarak antioksidan aktivite gösteren bir enzimdir. Okside glutasyon, normal şartlar altında birikmeyip sadece oksidatif stres söz konusu olunca birikmektedir (Akyol, 2004). Bu yöntem; hafif alkali ortamda, 5.5 ditiyobis-2-nitrobenzoik asidin (DTNB, Elman's reagent) örneklerdeki alifatik tiyol bileşikleriyle reaksiyonu sonucu her molekül tiyol başına oluşan p-nitro fenol anyon miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Berridge, Tan, McCoy, & Wang, 1996).

MCF-7 hücre kültür ortamında redükte glutasyon tayini yapılırken;

-0,2 M metafosforik asit, 2,7 mM EDTA-disodyum tuzu ve 5 M NaCl içeren proteinsizleştirme çözeltisi,

-0,3 M Na₂HPO₄ içeren Fosfat Tamponu,

-%1'lik Na-sitrat içerisinde çözülmüş olan DTNB ile hazırlanan Ellman Reaktifi kullanılmıştır.

0,2 ml lizat üzerine 0,3 ml proteinsizleştirme çözeltisi eklenerek 5 dk oda sıcaklığında bekletilen örnekler 2000 g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatandan 50 µl alınarak üzerine 0,2 ml fosfat tamponu, 25 µl Ellman Reaktifi eklenerek 412 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Bu değerlerin µg GSH karşılıkları belirli miktarlarda (0,1-0,25-0,5-1-2-3-4-5-10-20-30-40-50 µg) GSH içeren çözeltilerin 412 nm'deki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

3.8.6. Katalaz Aktivitesi

Katalazlar (CAT), hidrojen peroksit oksidasyonu ile yan ürün olarak moleküler oksijen üretir. Enzimin aktivitesi, üç temel alanın yapısal konformasyonuna bağlıdır. Enzimin aktif bölgesindeki hem parçasına, NADPH bağlayıcı domainde bağlanmış, indirgenmiş bir NADPH ve tetramerizasyon sırasında uzun peptid halkalarının iç içe geçmesi ile oluşturulan kompleks bir ikincil yapıya bağlı olarak üç boyutlu yapısı düzenlenir (Heck, Shakarjian, Kim, Laskin, & Vetrano, 2010). H₂O₂'nin degradasyonu, 2 katalaz-ferrikatalaz (su ile koordine edilmiş demir) ve bileşik I (bir oksijen atomuyla

komplekslenmiş demir) arasında dönüşüm yoluyla gerçekleştirilir. Katalaz ayrıca, moleküler suya indirgenen H₂O₂ tarafından enzimin oksidatif inaktivasyonunu (bileşik II'nin oluşumu) önlemek için NADPH'yi bir indirgenme değeri olarak bağlar. Katalaz enziminin aktivitesi de pH 7.0 ve 25°C'de H₂O₂ tüketilmesi sonucu meydana gelen absorbans değişimlerinin gözlenmesiyle belirlenen bir yöntemdir (Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum, & Kalayci, 2012).

Katalaz enziminin aktivitesi için pH 7,0'de 50 mM fosfat tamponu hazırlanmıştır. Kör olarak kullanılan fosfat tamponu içerisine H₂O₂ eklenerek 240 nm'de 0,500'e absorbans değeri ayarlanmış, daha sonra hazırlanan H₂O₂ içeren fosfat tamponu kör olarak kullanılarak her 5 µl'lik örnek için kuvarz küvetlerde değişen zamanlarda 240 nm dalga boyunda verilen absorbans değişim değerlerine bakılmıştır (Aebi 1984). Sonuçlar ekstinksiyon katsayısına göre hesaplanmış, hem katalaz aktivitesi (U/ml) hem de spesifik katalaz aktivitesi (U/mg) Eşitlik (3.9) ve (3.10)'daki denklemlerle hesaplanmıştır.

$$\text{Katalaz Aktivitesi (U/ml)} = \frac{\Delta A}{39,4 \text{ mM / cm}} \times \frac{V(\text{toplama})}{V(\text{örnek})} \quad (3.9)$$

$$\text{Spesifik Katalaz Aktivitesi (U/mg)} = \frac{\text{Katalaz Aktivitesi}}{\text{mg protein miktarı}} \quad (3.10)$$

3.9 İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analiz, GraphPad Prism yazılımı sürüm 6 (GraphPad Yazılımı, La Jolla, CA) kullanılarak yapılmıştır. Hücre proliferasyonu ve apoptoz analizi için istatistiksel farklılıkları hesaplamak için Two-Way ANOVA testi kullanılmıştır. IC₅₀ değerleri GraphPad Prism kullanılarak hesaplanmıştır. Kontrol ve tedavi edilen gruplar arasında oksidatif stres ve hücresele antioksidan aktivite ölçümleri arasındaki istatistiksel farklar ANOVA testi ile analiz edilmiş ve 0,05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.1 Sinapik Asit Yüklü Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Parametreler

Maksimum miktarda Sa içeren yüksek yükleme verimi ile nano boyutlu partiküllerin hazırlanması planlanmıştır. Bu nedenle yüklenebilecek en yüksek miktardaki Sa molekülünün tespiti için tüm değerler sabit tutularak bir tek sinapik asit molekülünün miktarı değiştirilerek sentezlenmiştir. FT-IR analizleri ile incelenen değişen sinapik asit miktarlarından maksimum 80 mg yüklenebileceği tespit edilmiştir. Az sayıda deney yapılarak çok sayıda veri elde etmeyi sağlayan Plackett-Burman deneysel tasarımı için sabit parametreler belirlenmiş ve 7 parametrede, iki seviyeli 8 adet deney tasarlanmıştır. Ayrıca üç adet deney orta parametrelerde sentezlenmiştir. Bu deneyler sonucunda en etkili Sa enkapsulasyon verimi ve boyutunu etkileyen en etkili üç parametrenin belirlenmesi planlanmıştır. Sentezlenen 11 adet nanopartikül için Tablo 4.1’de verilen parametreler kullanılmış, uygulanan deney planı Tablo 4.2’de gösterilmiş ve sentezlere ait veriler Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Sinapik asit yüklü nanopartiküllerin orta değer parametrelerinin sentezi için 80 mg Sa 1 ml DCM ve 1 ml etil alkol içerisinde, PLGA (100 mg) polimeri ise 0,5 ml DCM içerisinde çözülmüştür. Daha sonra iki çözelti karıştırılmış ve oluşan organik faz, sonikasyon (%80 güç) altındaki 5 ml PVA çözeltisi (% 1,5) üzerine peristaltik pompa yardımıyla sabit akış hızında (akış hızı 1: 5 ml/dk) eklenmiştir. Karışım sonikatör cihazı ile ve 90 sn süre ile (80 W) sonike edilerek emülsiyon elde edilmiştir. Bu emülsiyon daha sonra manyetik karıştırıcıda karıştırılmakta olan 35 ml % 0,1 PVA çözeltisi içine peristaltik pompa ile sabit akış hızında (akış hızı 2: 2 ml/dk) eklenmiştir. Nanopartikül çözeltisi organik çözücünün buharlaşması için 3 saat manyetik karıştırıcı üzerinde 800rpm hızla karıştırılmıştır. Nanopartikülleri çöktürmek için 9000 rpm’de 40 dk santrifüj işlemi uygulanmış ve çöktürme sonrası elde edilen nanopartiküllerin dış yüzeyinde bulunan surfaktan (PVA) kalıntılarını uzaklaştırmak için 35 ml saf su ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Her bir yıkama adımında 9000 rpm’de 30 dk

santrifüj uygulanarak nanopartiküller çöktürülmüştür. Elde edilen üst fazlar toplanarak enkapsüle edilemeyen sinapik asit konsantrasyonu belirlenmiştir. Katı nanopartikül çökeltisi liyofilize edilerek kurutulmuştur.

Tablo 4. 1 Plackett Burman Deneysel Tasarım için parametreler ve seviyeleri

Seviye		-1	0	1
PLGA miktarı, mg	Xp1	75	100	125
PVA kons. , %	Xp2	%1	%1,5	%2
Sonikasyon Gücü, Watt	Xp3	60	80	100
Sonikasyon Süresi, s	Xp4	30	60	90
Akış Hızı 1*, ml/dak	Xp5	4	5	6
Akış Hızı 2**, ml/dak	Xp6	1	2	3
Karıştırma Hızı***, rpm	Xp7	400	800	1200
<p>*PLGA-Sinapik Asit karışımının PVA çözeltisine (%1-2)üzerine eklenme hızı</p> <p>**Emülsiyon fazının %0,1 PVA üzerine eklenme hızı</p> <p>***Karışımda bulunan organik çözücüyu buharlaştırmak için kullanılan manyetik karıştırıcı dönüş hızı</p>				

Tablo 4. 2 Plackett Burman Deneysel Tasarım için deney planı

Deney No	PLGA	PVA	Sonikasyon Gücü	Sonikasyon Süresi	Akış Hızı 1	Akış Hızı 2	Karıştırma Hızı
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1	-1	1	1
3	1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	1	-1	-1	1	-1
5	-1	1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	1	1	-1	-1
7	-1	1	-1	1	1	1	-1
8	-1	-1	1	-1	1	1	1
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0

Tablo 4. 3 Plackett-Burman Design Yöntemi ile yapılan sentez sonuçları

Deney No	Xp 1	Xp 2	Xp 3	Xp 4	Xp 5	Xp 6	Xp 7	E.E. (%)	Boyut (nm)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	40,21	161
2	1	-1	-1	1	-1	1	1	59,78	346
3	1	1	-1	-1	1	-1	1	55,04	212
4	1	1	1	-1	-1	1	-1	55,88	152
5	-1	1	1	1	-1	-1	1	73,83	619
6	1	-1	1	1	1	-1	-1	53,29	167
7	-1	1	-1	1	1	1	-1	47,59	141
8	-1	-1	1	-1	1	1	1	60,25	1363
9	0	0	0	0	0	0	0	53,00	164
10	0	0	0	0	0	0	0	56,36	146
11	0	0	0	0	0	0	0	60,21	148

Plackett-Burman deneysel tasarım metodu ile sentezlenen partiküllerde Design Expert (7.0) programı kullanılarak geliştirilen model denklemler Eşitlik (4.1) ve (4.2)'de verilmiştir.

$$R1 (EE) = 55,73 + 0,26 \times Xp^1 + 2,35 \times Xp^2 + 5,08 \times Xp^3 + 2,89 \times Xp^4 - 1,69 \times Xp^5 + 0,14 \times Xp^6 + 6,49 \times Xp^7 \quad (4.1)$$

$$R2 (Boyut) = 395,59 - 176,16 \times Xp_1 - 114,01 \times Xp_2 + 179,96 \times Xp_3 - 76,69 \times Xp_4 + 75,69 \times Xp_5 + 105,36 \times Xp_6 + 239,54 \times Xp_7 \quad (4.2)$$

Design Expert deneysel tasarım programı ile yapılan ANOVA analizi sonuçları (Tablo 4.4) incelendiğinde parçacık boyutu için geliştirilen model denklemin istatistiksel olarak %99 güvenilirlik düzeyinin üzerinde olduğu (p -değeri: 0,0005), EE için geliştirilen model denklemin ise %87 (p değeri: 0,1235) güvenilirlik düzeyinde olduğu görülmüştür. Her iki cevap için de deneylerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4. 4 Plackett-Burman deneysel tasarım metodu ile modellenmiş EE ve Boyut için ANOVA sonuçları

	R1: % EE	R2: Boyut (nm)
R ²	0,963	0,9998
Standart Sapma	3,61	9,76
F-Değeri	7,44	1877,07
P-Değeri	0,1235	0,0005

Enkapsülasyon etkinliğine ait model denkleme bakıldığında en etkili parametrelerin sırası ile karıştırma hızı (Xp7), sonikasyon gücü (Xp3), sonikasyon süresi (Xp4), PVA miktarı (Xp2), akış hızı 1 (Xp5), PLGA miktarı (Xp1) ve akış hızı 2 (Xp6) olduğu görülmüştür.

Boyuta ait model denkleme bakıldığında ise en etkili parametrelerin sırası ile karıştırma hızı (Xp7), sonikasyon gücü (Xp3), PLGA miktarı (Xp1), PVA miktarı (Xp2), akış hızı 2 (Xp6), sonikasyon süresi (Xp4) ve akış hızı 1 (Xp5) olduğu görülmüştür.

Bu denklemlere göre her iki modelde de etkili olan parametrelere bakılmış ve Box-Behnken Deneysel Tasarım Metodu ile sentezlenecek optimize nanopartikül formülasyonları için en etkili üç parametre seçilmiştir. Karıştırma hızı (Xp7) ve sonikasyon gücünün (Xp3) her iki model denkleminde de yüksek katsayıya sahip olduğu görülmüştür. Sonraki en etkili parametre ise enkapsülasyon etkinliği için sonikasyon gücü (Xp4); boyut içinse PLGA miktarıdır (Xp1). PLGA miktarı (Xp1) diğerine kıyasla daha yüksek katsayıya sahip olduğundan üçüncü parametre olarak tercih edilmiştir.

İkinci aşamada, Plackett-Burman tarama deneysel tasarım metodu ile seçilen faktörlerin etki ve etkileşimlerini belirlemek için üç faktörlü ve üç seviyeden oluşan Box-Behnken deneysel tasarım metodu ile 17 sentez daha yapılmıştır. Tablo 4.5'te bu parametreler için seviyeler verilmiş, uygulanan Box Behnken deney planı Tablo 4.6'da ve sonucunda

üretileen nanopartiküllerin parçacık boyutu ve enkapsulasyon etkinliği Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4. 5 Box Behnken Deneysel Tasarım için parametreler ve seviyeleri

Seviye		-1	0	1
PLGA miktarı, mg	X₁	75	100	125
Karıştırma Hızı, rpm	X₂	400	700	1000
Sonikasyon Gücü, Watt	X₃	60	80	100

Tablo 4. 6 Box Behnken Deneysel Tasarım için uygulanan deney planı

Deney No	X1	X2	X3
	PLGA	Karıştırma Hızı	Sonikasyon Gücü
1	0	0	0
2	0	1	1
3	1	1	0
4	1	0	1
5	-1	-1	0
6	0	1	-1
7	0	0	0
8	-1	1	0
9	1	0	-1
10	-1	0	-1
11	-1	0	1
12	0	0	0
13	1	-1	0
14	0	-1	-1
15	0	0	0
16	0	-1	1
17	0	0	0

Tablo 4. 7 Box Behnken Deneysel Tasarım deney sonuçları

Deney No	X1 PLGA	X2 Karıştırma Hızı	X3 Sonikasyon Gücü	EE (%)	%Hata (EE)	Boyut (nm)	% Hata (Boyut)
1	0	0	0	54,7	14,6	149,9	1,7
2	0	1	1	59,5	0,6	170,8	4,3
3	1	1	0	61,9	0,9	157,3	3,7
4	1	0	1	58,1	1,6	163,7	0,3
5	-1	-1	0	48,4	1,1	150,4	3,6
6	0	1	-1	57,9	1,0	164,4	3,8
7	0	0	0	51,4	3,5	152,3	1,2
8	-1	1	0	59,2	2,6	154,8	2,3
9	1	0	-1	48,8	2,3	157,9	0,1
10	-1	0	-1	55,6	1,6	149,5	0,3
11	-1	0	1	51,	2,2	149,6	3,2
12	0	0	0	52,3	1,1	158,9	2,5
13	1	-1	0	53,7	2,8	161,3	2,0
14	0	-1	-1	45,8	0,8	145,0	2,7
15	0	0	0	52,2	0,5	159,3	2,0
16	0	-1	1	48,6	1,2	153,7	0,3
17	0	0	0	56,3	5,1	158,0	4,2
Ortalama					2,6		2,3

Tablo 4.7 incelendiğinde Sa molekülünün yaklaşık %46 ile %62 arasındaki değerlerde nanopartiküle enkapsüle olduğu görülmektedir. Ayrıca elde edilen nanopartiküllerin

boyutları 145 nm ile 171 nm arasında değiştiği parçacık boyut analizleri sonucunda gösterilmiştir. Orta noktada gerçekleştirilen tekrarlı sentez sonuçları incelendiğinde deneylerin kendi içinde oldukça tutarlı olduğu görülmektedir.

Modelin deneysel verilere uygunluğu hata analizi Eşitlik (4.3)'te verilen denklem ile hesaplanmıştır. EE için % hata 2,58 iken boyut için % hata 2,24 olarak bulunmuştur. Yapılan hata analizlerine bakıldığında deneysel veriler ile model denklemden elde edilen teorik verilerin birbiriyle oldukça uyumlu olduğu görülmektedir.

$$\%HATA = \frac{Deneysel\ Veri - Teorik\ Veri}{Deneysel\ Veri} \times 100 \quad (4.3)$$

Box-Benhken deneysel tasarım metodu ile sentezlenen partiküllerde Design Expert (7.0) programı kullanılarak geliştirilen model denklemler Eşitlik (4.4) ve (4.5)'te verilmiştir.

$$\%EE = 52,65 + 0,94 \times X_1 + 5,24 \times X_2 + 1,23 \times X_3 - 0,65 \times X_1X_2 + 3,31 \times X_1X_3 - 0,31 \times X_2X_3 + 1,86 \times X_1^2 + 1,29 \times X_2^2 - 0,99 \times X_3^2 \quad (4.4)$$

$$Boyut = 156,18 - 4,49 \times X_1 - 4,61 \times X_2 + 2,62 \times X_3^2 - 2,1 \times X_1X_2 \quad (4.5)$$

Boyuta ait model denklem istatikselsel olarak anlamlı olmayan etkiler çıkarılarak elde edilmiştir (Eşitlik 4.5). Design Expert (7.0) deneysel tasarım programı ile yapılan ANOVA analizi sonuçları (Tablo 4.8) incelendiğinde EE ve boyut için geliştirilen model denklemlerin istatikselsel olarak %95 güvenirlik düzeyinde olduğu görülmektedir.

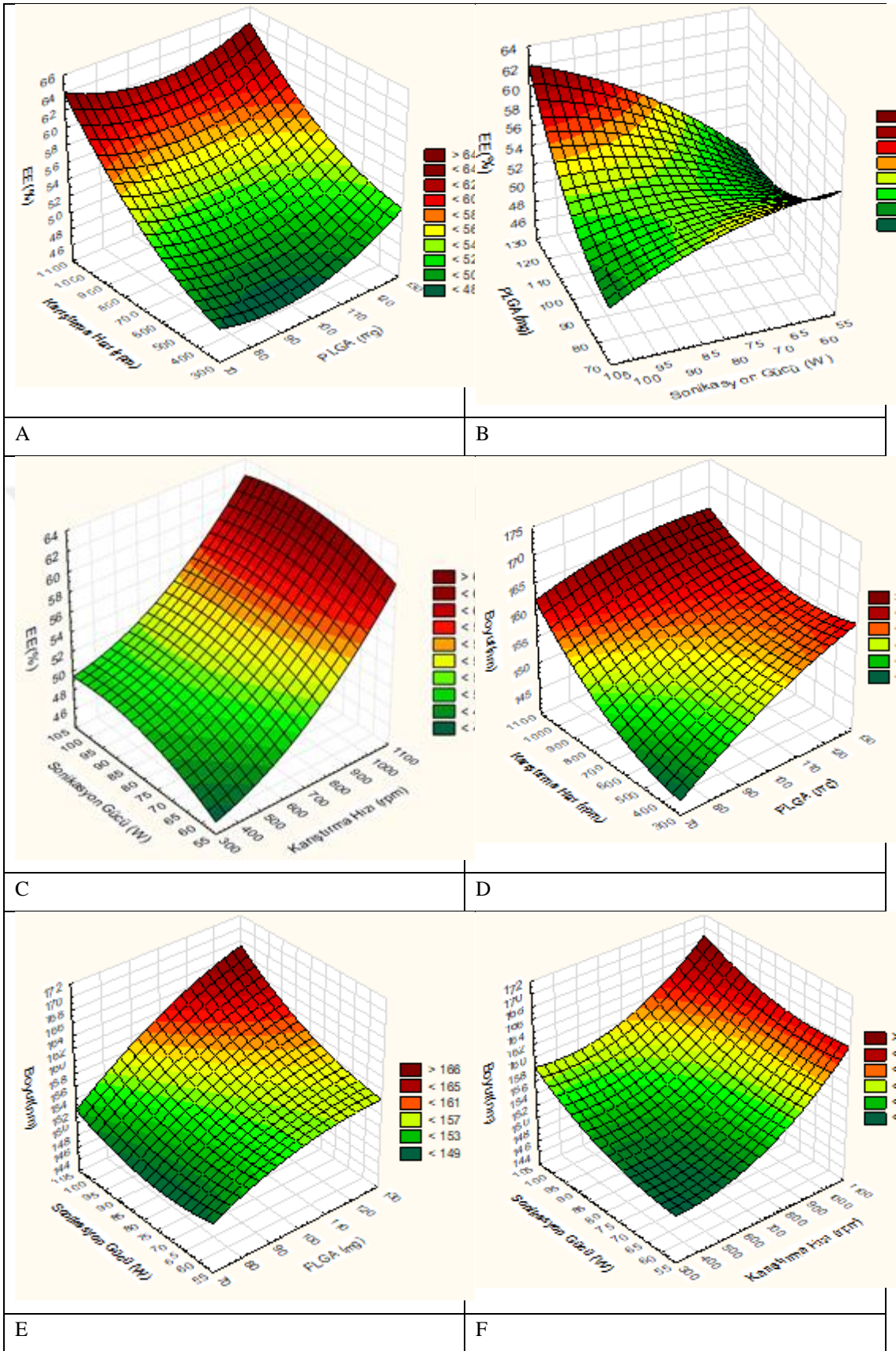
Tablo 4. 8 Box-Benhken deneysel tasarım metodu ile modellenmiş EE ve boyut için ANOVA sonuçları

	R1: % EE	R2: Boyut (nm)
R ²	0,9482	0,582
Standart Sapma	1,68	5,14
F-Değeri	12,19	3,83
P-Değeri	0,0033	0,0347

Denklemdaki parametre katsayıları dikkate alındığında enkapsülasyon etkinliği üzerinde en etkili parametrenin 5,24 katsayısı ile karıştırma hızı (Xb2) olduğu sonucuna varılabilir; en az etkili parametre ise 0,94 katsayısına sahip PLGA miktarıdır (Xb1). Ayrıca, PLGA miktarının (Xb1) ve sonikasyon gücünün (Xb3) etkileşimi 3,31 katsayısı ile lineer etkileşimlerden ve diğer tüm ikinci dereceden etkileşimlerden daha yüksektir. Parçacık boyutu üzerindeki en etkili parametre, 4,61 katsayısı ile karıştırma hızı (Xb2); en az etkili olan ise 2,62 katsayılı sonikasyon gücüdür (Xb3). 4,49 katsayılı PLGA miktarı da partikül büyüklüğü üzerinde çok etkilidir.

Cevap yüzey grafikleri:

Parametrelerin %EE ve nanopartikül boyutu üzerine ikili etkilerinin daha net bir şekilde gözlemlenebilmesi için yüzey grafikleri Statistica 13.0 programı kullanılarak oluşturulmuş ve Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4. 1 Cevap yüzey grafikleri

Enkapsülasyon etkinliğini PLGA miktarı ve karıştırma hızıyla ilişkilendiren cevap yüzey grafiği (Şekil 4.1A) incelendiğinde PLGA miktarının tek başına ve/veya karıştırma hızıyla beraber EE üzerinde düşük oranda etkili olduğu ancak artan karıştırma hızıyla daha fazla miktarda Sa molekülünün yapıya enkapsüle olduğu görülmektedir. Enkapsülasyon etkinliğini PLGA miktarı ve sonikasyon gücüyle ilişkilendiren cevap yüzey grafiği (Şekil 4.1B) incelendiğinde sonikasyon gücünün yüksek değerlerinde artan PLGA ile EE'nin arttığı ancak düşük sonikasyon gücü değerlerinde PLGA'nın artmasıyla EE değerinin azaldığı görülmektedir. Enkapsülasyon etkinliğini sonikasyon gücü ve karıştırma hızıyla ilişkilendiren cevap yüzey grafiği (Şekil 4.1C) incelendiğinde yüksek karıştırma hızının tek başına EE değerini oldukça artırdığı ancak artan sonikasyon gücü ile beraber EE değerini sadece bir miktar daha artırdığı görülmektedir. Boyutu karıştırma hızı ve PLGA miktarı ile ilişkilendiren cevap yüzey grafiği (Şekil 4.1D) incelendiğinde PLGA ve karıştırma hızının boyutu doğru orantılı olarak etkilediği görülmektedir, en düşük nanopartikül boyutu her iki parametrenin de en düşük değerinde elde edilmiştir. Şekil 4.1E incelendiğinde sonikasyon gücü ve PLGA miktarlarının bireysel artışıyla boyutun hafifçe arttığı görülmektedir. Ancak bu iki parametrenin ikili etkileşimi boyutu artırma yönünde oldukça etkilidir. Boyuta ait tüm yüzey grafikleri incelendiğinde ikili etkileşimler benzer etkiler göstermektedir. Bu durum grafiklerin yüzeyinde görülen bükülmeden anlaşılmaktadır. Boyutu sonikasyon gücü ve karıştırma hızı ile ilişkilendiren cevap yüzey grafiği (Şekil 4.1F) incelendiğinde benzer şekilde sonikasyon gücü ve karıştırma hızının aynı anda artmasıyla boyutun arttığı görülmektedir.

4.2 Optimize Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

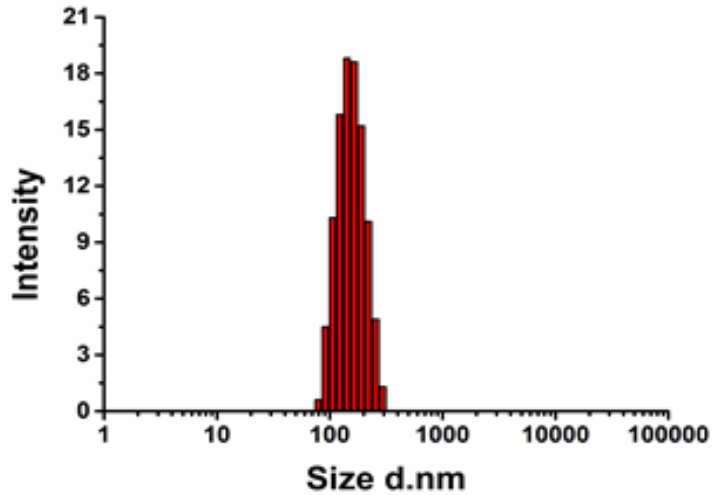
Enkapsülasyon etkinliği ve partikül büyüklüğü ilaç dağılım sistemleri için en önemli anahtar noktalardan ikisidir. Nanopartiküllerin sadece ekonomik açıdan avantajlı olan yüksek enkapsülasyon verimine sahip olması değil, aynı zamanda gerçek uygulamalar için yeterli olan parçacık boyutuna da sahip olması gerekir. Uygulanan deneysel tasarım sonucu nanopartikül optimizasyonunda minimum boyutlarda, enkapsülasyon etkinliğini maksimize eden optimum parametreler belirlenmiştir. Sinapik asit yüklü polimerik nanopartiküller, faktörlerin optimum noktasını doğrulamak için optimum koşullarda üç tekrarlı olarak sentezlenmiş ve optimize nanopartikülün sonucu Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablodan görülebileceği gibi optimum parametreler kullanılarak %1,52-%3,58 gibi küçük hatalarla yaklaşık %63 enkapsülasyon verimliliğine sahip, ortalama 170 nm boyutunda nanopartiküller elde edilmiştir.

Tablo 4. 9 Optimize formülasyona ait veriler

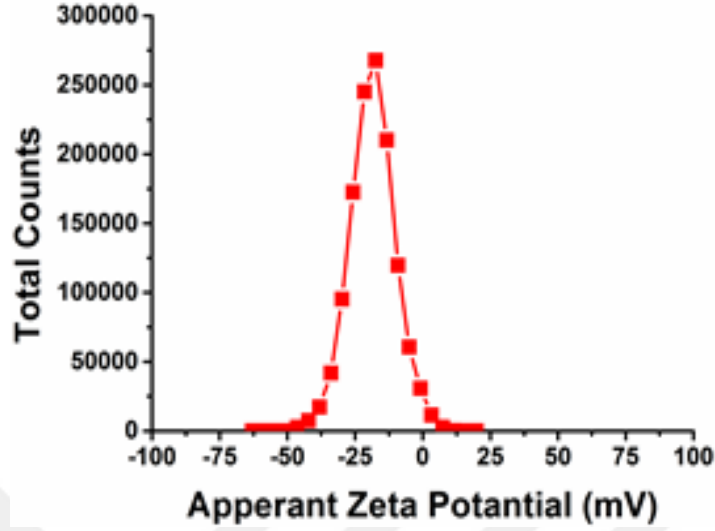
Parametre			Model		Deneysel (Ort.)		% Hata	
PLGA (mg)	Sonikasyon Gücü (watt)	Karıştırma Hızı (rpm)	EE (%)	Boyut (nm)	EE (%)	Boyut (nm)	EE (%)	Boyut (nm)
116,73	96,72	995,62	62,04	164,53	63,36	170,63	1,52	3,58

Optimize nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyel analizi foton korelasyon spektrofotometresi kullanılarak yapılmış, optimize partiküllere ait boyut değerleri ortalama 170,63 nm olarak, zeta potansiyel değerleri ortalama -17,37 olarak ve partiküllerin dağılımının homojenliğini belirleyen çoklu dağılım indeksleri 0,19 olarak ölçülmüştür. Optimize partiküllere ait boyut dağılım grafiği Şekil 4.2’de, zeta potansiyel grafiği ise Şekil 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4. 2 Optimize nanopartiküllere ait boyut dağılım analiz grafiği

Optimize nanopartiküllere boyut dağılımı grafiği incelendiğinde PDI değerine de uygun olarak monodisperse dağılımda partiküllerin sentezlendiği görülmektedir.

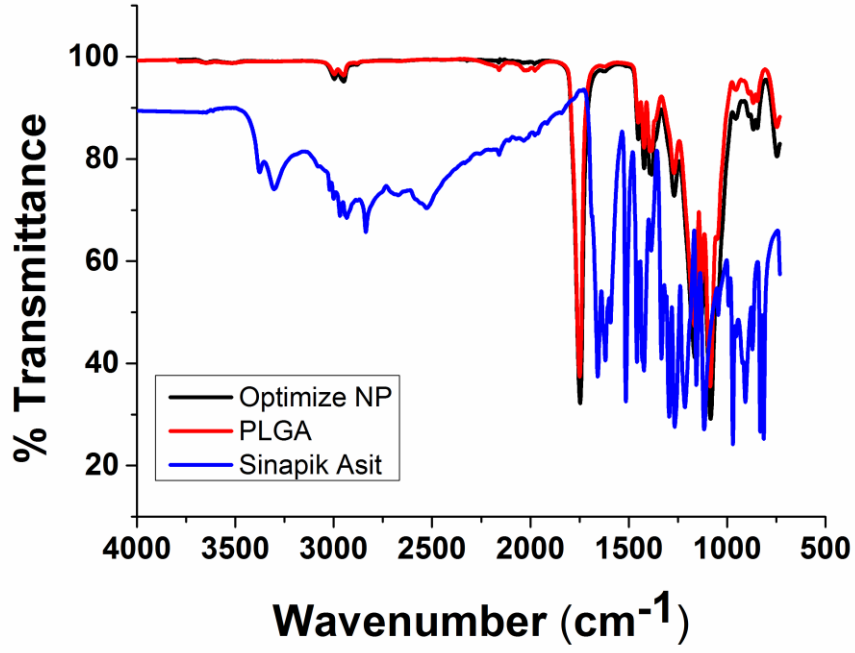


Şekil 4. 3 Optimize nanopartiküllere ait zeta potansiyel dağılım analiz grafiği

4.2.1. FT-IR Analizi

Optimize nanopartiküllerin yüzeyinde yer alan etken madde tespiti için etken madde (Sa), polimer (PLGA) ve üretilen optimize nanopartiküle (SaNP) ait FT-IR analizleri yapılmıştır. Şekil 4.4'te Sa, PLGA polimeri ve SaNP'ye ait FT-IR spektrumları verilmiştir.

PLGA polimerinin FT-IR spektrumu incelendiğinde $2993-2989\text{ cm}^{-1}$ aralığında C-H ve CH_2 'ye ait C-H gerilmelerine ait piklerin sırası ile çıktığı görülmektedir. 1750 cm^{-1} civarındaki keskin ve şiddetli pik polimere ait esterdeki C=O bağına ve $1160-1090\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki pikin ise C-O bağına ait gerilme bandı piki olduğu görülmektedir (Tülin Arasoglu, Derman, & Mansuroglu, 2015). Sinapik asit molekülüne ait FT-IR spektrumu incelendiğinde ise 3600 cm^{-1} civarındaki pikin -OH gerilmesinden olduğu, $1600-1750\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki geniş ve şiddetli piklerin ise C=O, C=C, ve C-O gerilmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

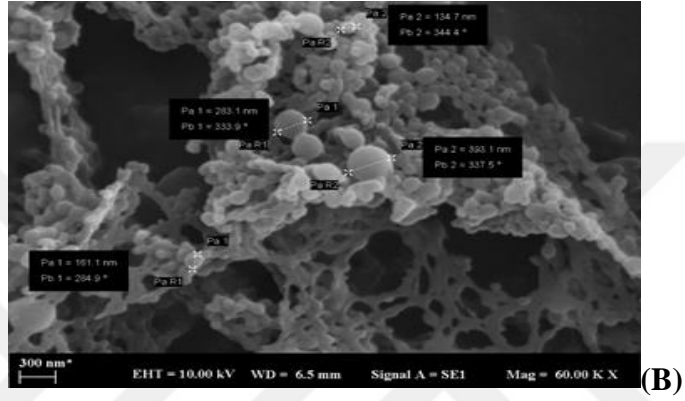
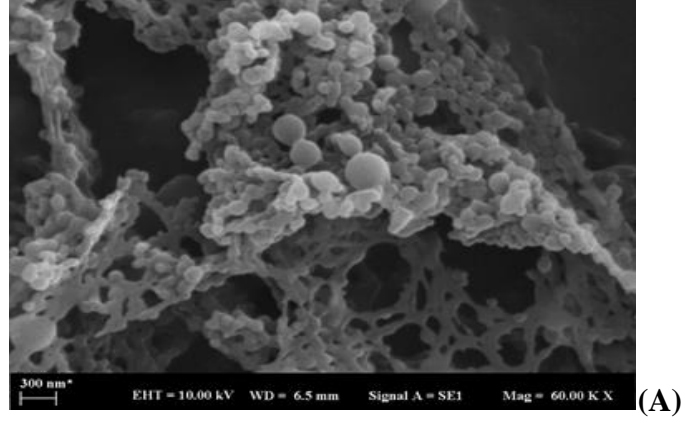


Şekil 4. 4 Sa, PLGA ve optimize SaNP'ye ait FT-IR spektrumları

FT-IR spektrumları karşılaştırmalı olarak incelendiğinde Sa'nın 1600-1750 cm^{-1} aralığındaki karakteristik gerilme ve eğilme titreşimlerine ait piklerinin nanopartiküllere ait FT-IR spektrumunda gözlenmemesi Sa'nın yüzey adsorpsiyonu olmaksızın nanopartiküllerin içerisine başarı ile yüklendiğini göstermektedir.

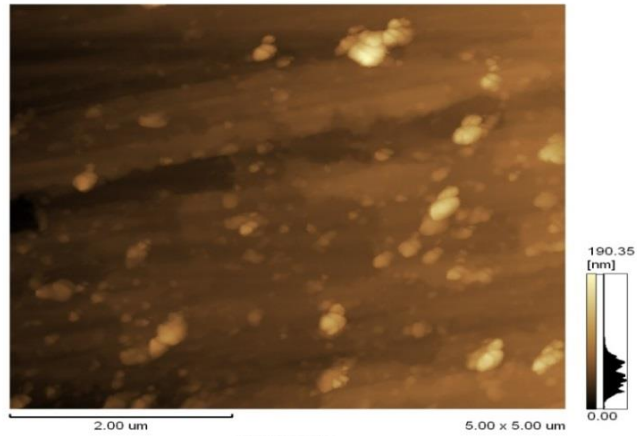
4.2.2. Morfolojik Analiz (SEM ve AFM)

Üretilen minimum boyutlarda, maksimum enkapsülasyon etkinliğine sahip nanopartiküllerin şekil ve yüzey analizleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) incelenmiştir. Şekil 4.5'te verilen SEM görüntüleri incelendiğinde sentezlenen optimize nanopartiküllerin küresel morfolojide ve pürüzsüz yüzel özelliklerinde ve homojen boyut dağılımında olduğu görülmektedir. Buna ek olarak nanopartiküllerin boyutlarının dinamik ışık saçılması yöntemi ile elde edilen hidrodinamik boyut sonuçları ile de uyumlu olduğu aynı SEM görüntüsünün ölçeklendirilmesiyle tespit edilmiştir.



Şekil 4. 5 Optimize nanopartiküllere ait 60.000X büyütme oranı ile çekilmiş SEM görüntüsü (A), ölçeklendirilmiş SEM görüntüsü (B).

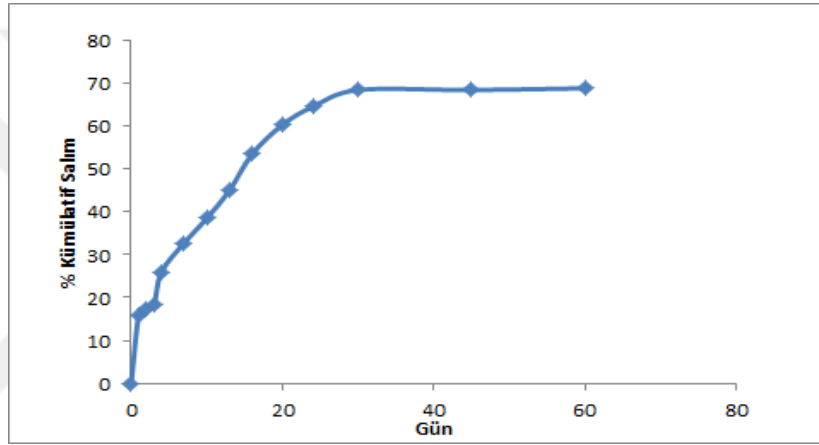
Shimadzu Scanning Probe Microscope-SPM 9600 atomik kuvvet mikroskopunda temassız olarak analiz edilen nanopartiküllere ait AFM görüntüsü Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4. 6 Optimize nanopartiküllere ait AFM görüntüsü.

4.2.3. In vitro Salım Çalışmaları

Deneysel tasarım sonucu sentezlenen SaNP'nin biyolojik sistemdeki salınımı, hücre kültürü öncesi incelenmiştir. 37 °C' de, 7,4 pH'daki PBS içerisinde yatay olarak çalkalamaya (200 rpm) bırakılan nanopartiküllerin salım deneyleri 60 günlük süre ile gerçekleştirilmiştir. Santrifüj edilen örneklerin üst fazları toplanmış ve 306 nm'de absorbans ölçümleri değerlendirilmiştir. Şekil 4.7'de verilen zamana bağlı olarak nanopartiküllerin kümülatif salım grafiği incelendiğinde Sa molekülünün nanopartiküllerden salımının kontrollü bir şekilde artarak gerçekleştiği ve 60. gün sonunda yüklenen madde miktarının %68,75'ini nanopartiküllerden salındığı görülmüştür.



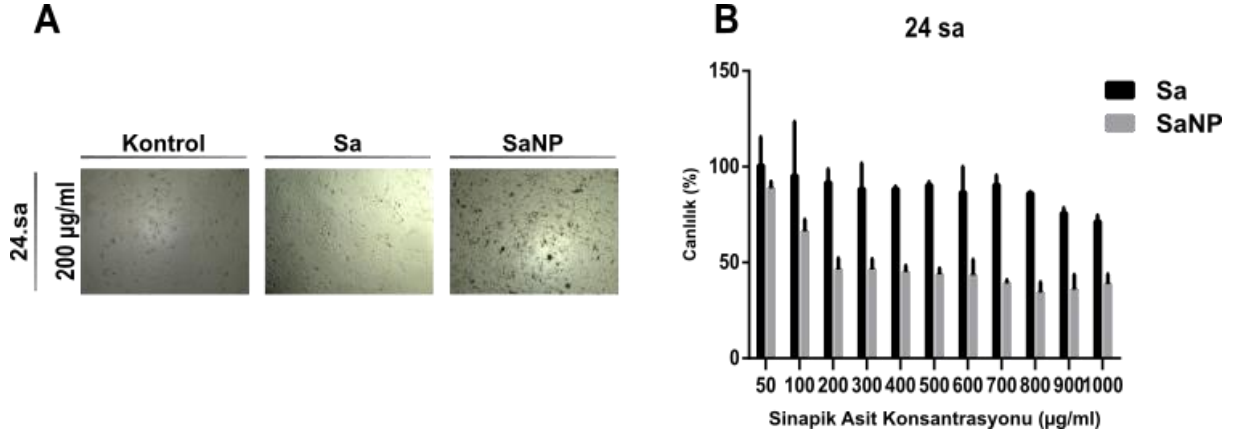
Şekil 4. 7 Nanopartiküllerin zamana bağlı salım profili

4.3 In vitro Hücre Kültürü Çalışmaları

4.3.1. MTT Yöntemi

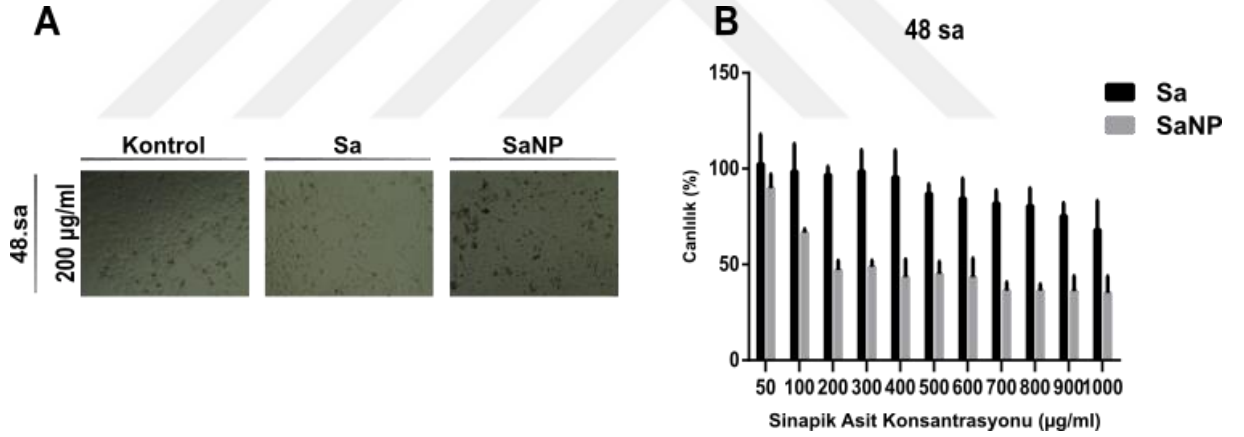
Deneysel tasarım yöntemleri ile sinapik asit yüklü PLGA nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiş ve böylece maksimum enkapsülasyon verimini, minimum partikül boyutunu sağlayan proses parametrelerinin optimize edilmesi sağlanmış ve hücre kültürü çalışmalarında optimize edilmiş SaNP kullanılmıştır.

Sa ve optimize SaNP formülasyonları 50-100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000 µg/ml konsantrasyonlarının insan meme kanseri MCF-7 ve tumerojenik olmayan meme epitelyal MCF10A hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi MTT ile belirlenmiştir. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyondan sonra hücrelerin morfolojileri inverted mikroskop altında değerlendirilmiştir (Şekil 4.8, 4.9, 4.10).



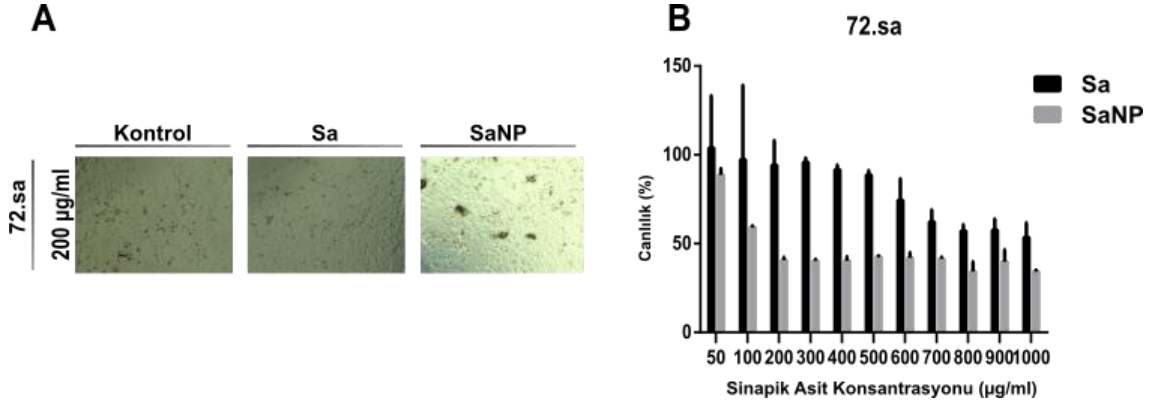
Şekil 4. 8 (A) Kontrol, Sa (200 µg/ml) ve SaNP (200 µg/ml) ile 24 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin faz kontrast mikroskobunda 5X objektif altında morfolojik görüntüleri (B) Sa ve SaNP ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin yüzde canlılık grafiği

Şekil 4.8B’de MCF-7 hücrelerine uygulanan Sa ve SaNP’ye ait farklı konsantrasyonlarda ki (0-1000 µg/ml) hücre canlılık oranları gösterilmiştir. 24. saatte serbest Sa’nın MCF-7 hücrelerini inhibe etmeye başladığı 500 µg/ml ve üzeri konsantrasyonda ve 1000 µg /ml konsantrasyonda Sa’nın MCF-7 hücrelerinin %29’unu inhibe ettiği görülmüştür. SaNP’ye ait IC₅₀ değeri ise 180 µg /ml olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 9 (A) Kontrol, Sa (200 µg/ml) ve SaNP (200 µg/ml) ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin faz kontrast mikroskobunda 5X objektif altında morfolojik görüntüleri (B) Sa ve SaNP ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin yüzde canlılık grafiği (48 saat).

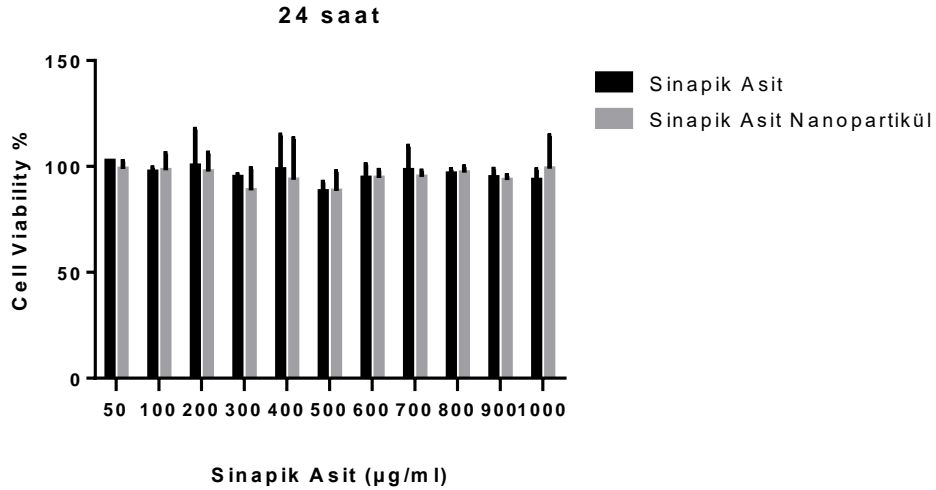
Şekil 4.9B’de bulunan grafikte serbest Sa molekülü ve optimize SaNP’ye ait farklı konsantrasyonlarda ki hücre canlılık oranları gösterilmiştir. 48. saatte serbest Sa molekülünün 1000 µg/ml konsantrasyonda MCF-7 hücrelerinin %32’sini inhibe ettiği görülmüştür. MCF-7 hücrelerinde SaNP’ye ait IC₅₀ değeri 168 µg /ml olarak bulunmuştur.



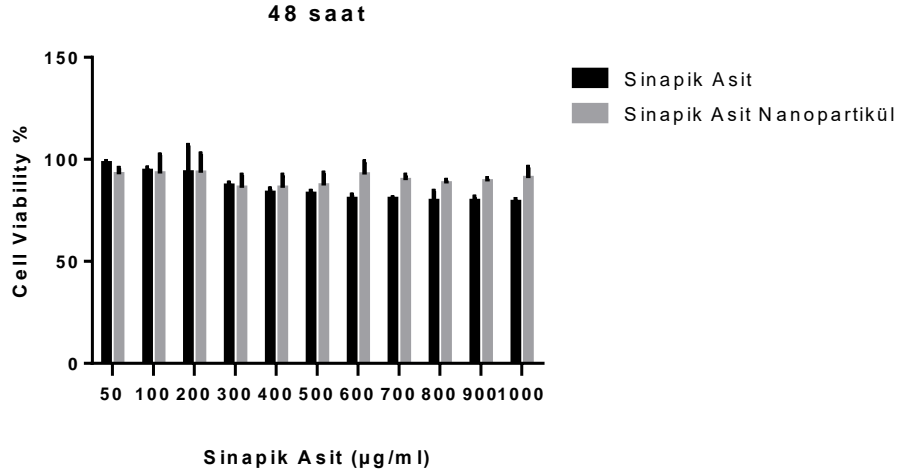
Şekil 4.10 (A) Kontrol, Sa (200 µg/ml) ve SaNP(200 µg/ml) ile 72 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin faz kontrast mikroskobunda 5X objektif altında morfolojik görüntüleri (B) Sa ve SaNP ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin yüzde canlılık grafiği (72 saat)

Şekil 4.10B’de bulunan grafiklerde serbest Sa molekülü ve optimize SaNP’ye ait farklı konsantrasyonlarda ki MCF-7 hücrelerinin hücre canlılık oranları gösterilmiştir. 72. saatte serbest Sa’nın 1000 µg/ml konsantrasyonda MCF-7 hücrelerinin %47’sini inhibe ettiği görülmüştür. MCF-7 hücrelerinde SaNP’ye ait IC₅₀ değeri 145 µg/ml olarak bulunmuştur.

Sa ve SaNP’nin biyolojik aktivitesinin incelenmesi amacıyla yapılan deneyler (PCNA, TUNEL ve Biyokimyasal analizler) için SaNP’nin IC₅₀ değerinin alt ve üst sınırlarını kapsayan 100,150 ve 200 µg/ml konsantrasyonları kullanılmıştır.



Şekil 4.11 MCF10A hücrelerinde Sa ve Optimize SaNP’ye ait 24. saat hücre canlılık grafikleri.



Şekil 4. 12 MCF10A hücrelerinde Sa ve SaNP ait 48. saat hücre canlılık grafikleri.

Sa molekülü ve SaNP'ye ait farklı konsantrasyonlarda (0-1000 µg/ml) hücre canlılık oranlarına bakıldığında 24, 48 ve 72. saatte MCF10A hücreleri üzerinde toksik etki görülmemiştir. Farklı konsantrasyonlarda Sa ve SaNP ile muamele edilen MCF-10A hücre canlılık oranları şekil 4.11 ve şekil 4.12'de verilmiştir.

4.3.2. Hücre Proliferasyon Testi

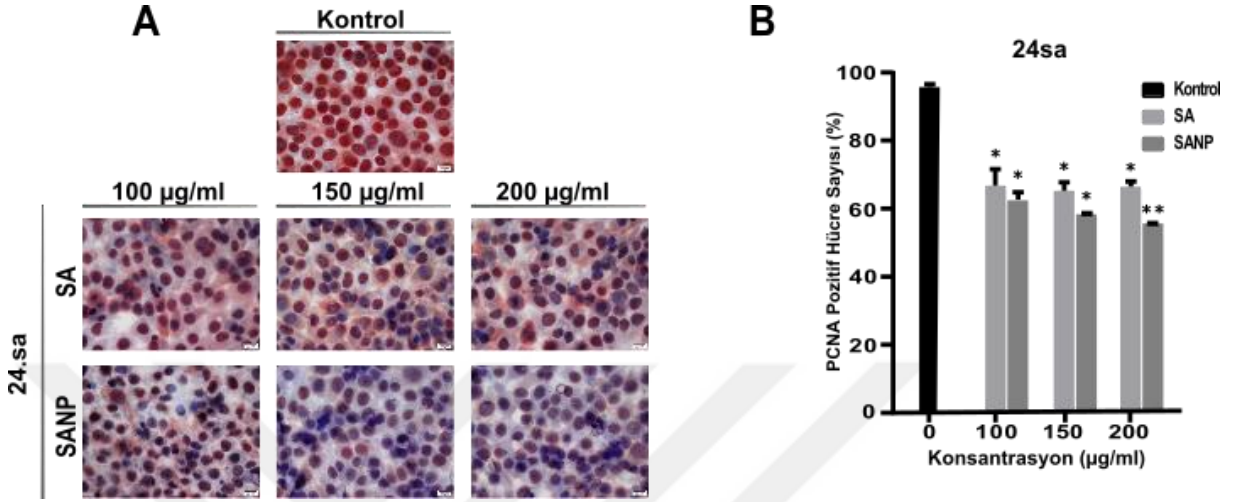
Sa ve SaNP'ye ait MTT testi ile elde edilen IC₅₀ değerleri sonucunda; proliferasyon, apoptoz ve biyokimyasal analizler için MCF-7 insan meme kanseri ve tumerojenik olmayan meme epitelyal MCF10A hücrelerine uygulanacak konsantrasyonlar 100-150-200 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Immünositokimyasal yöntemle Sa ve SaNP'lerin farklı konsantrasyonlarının (100-150-200 µg/ml) MCF-7 ve MCF10A hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonucunda PCNA proliferasyonu belirlenmiştir.

PCNA ile immünositokimyasal işaretleme sonucunda; Sa ve SaNP ile 24 saat muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde tüm konsantrasyonlarda kontrol hücrelerine göre hücre proliferasyonunda bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13A).

24 saatlik inkübasyon sonrasında kontrol grubu hücrelerinde PCNA pozitif işaretli olan hücre sayısı %94,23, 100 µg/ml Sa ile muamele edilen MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde PCNA pozitif olan hücre sayısı %67,97, 150 µg/ml Sa ile muamele edilen hücrelerde %64,43 ve 200 µg/ml Sa uygulanan hücrelerde ise %66,27 olarak saptanmıştır. 100 µg/ml SaNP uygulanan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde

PCNA pozitif olan hücre sayısı ise %62,64, 150 µg/ml SaNP uygulanan hücrelerde %58,56 ve 200 µg/ml SaNP uygulanan hücrelerde ise %55,37 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13B).

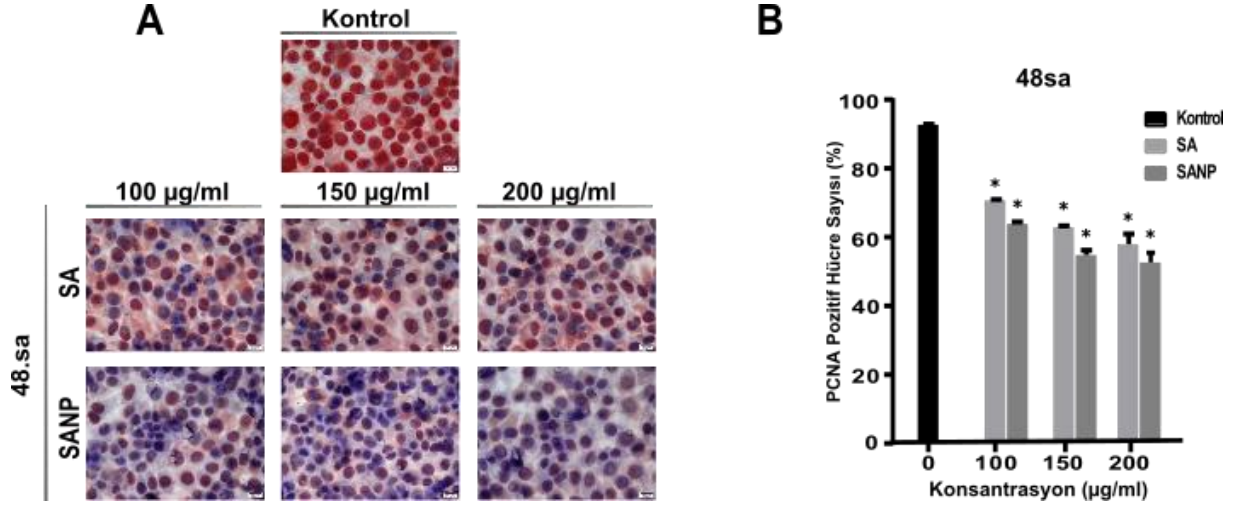


Şekil 4. 13 (A) Kontrol , Sa ve SaNP ile 24 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin PCNA ile immünohistokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x) .(B) Sa ve SaNP'nin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki proliferasyonu (24 saat) (*p<0,05, **p<0,03)

MCF-7 meme kanseri hücrelerinin 48 saat Sa ve SaNP ile muamele edilmesi sonucunda uygulanan konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre PCNA proliferasyonunda azalma olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.14A).

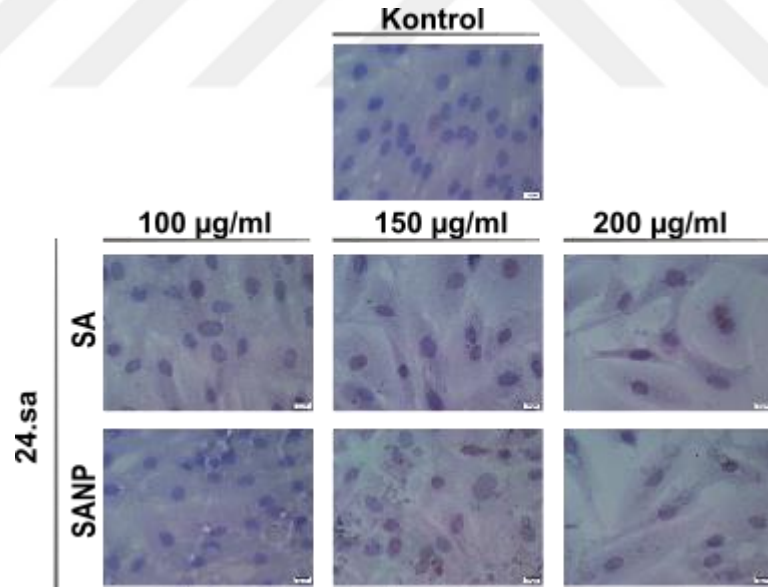
MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon sonrasında kontrol grubu hücrelerde PCNA pozitif olan hücre sayısı %92,21 olarak belirlenmiştir. Sa ile muamele edilen MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde 100 µg/ml konsantrasyonda PCNA pozitif olan hücre sayısı %70,33, 150 µg/ml konsantrasyonda %62,21 ve 200 µg/ml konsantrasyonda ise 56,96 olarak hesaplanmıştır. SaNP uygulanan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde ise 100 µg/ml konsantrasyonunda %63,29, 150 µg/ml SaNP konsantrasyonunda %54,70 ve 200 µg/ml konsantrasyonunda ise %52 olarak saptanmıştır (Şekil 4.14B).

100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde Sa ve SaNP ile 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde PCNA hücre proliferasyonu kontrol grubuna göre ANOVA testi ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (*p<0,05, **p<0,03).



Şekil 4. 14 (A) Kontrol, Sa ve SaNP ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin PCNA ile immünohistokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x). (B) Sa ve SaNP'nin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki proliferasyonu (48 saat) (*p<0,05).

MCF10A tümörojenik olmayan meme epitelyal hücrelerinde 24 saat 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda uygulanan Sa ve SaNP sonucunda PCNA hücre proliferasyonunda kontrol grubuna göre bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.15).

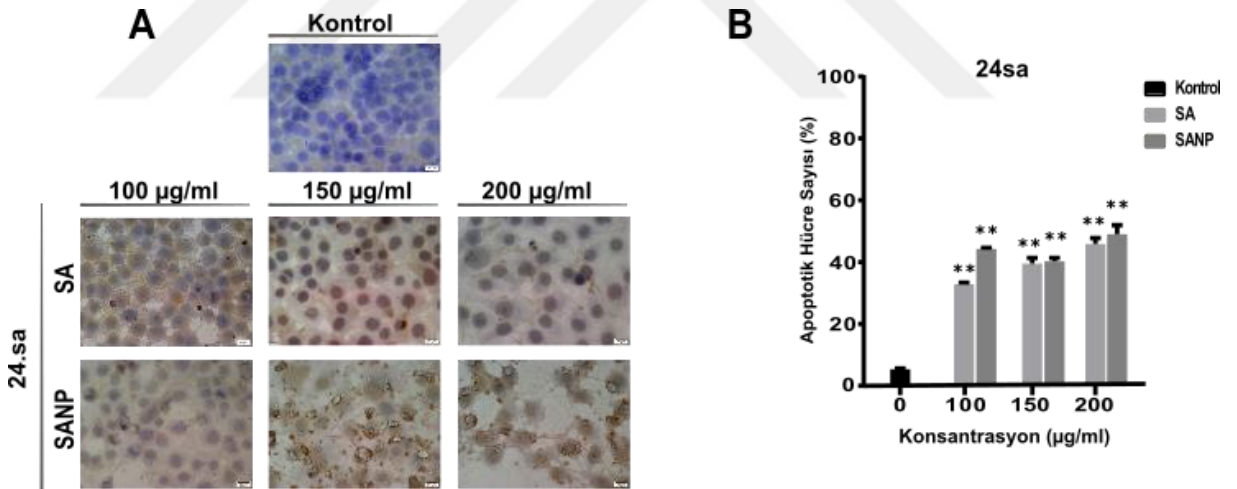


Şekil 4. 15 Kontrol, Sa ve SaNP ile 24 saat muamele edilen MCF 10A hücrelerinin PCNA ile immünohistokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x).

4.3.3. TUNEL Testi

Sa ve SaNP'nin farklı konsantrasyonlarının (100-150-200 µg/ml) insan meme kanseri MCF-7 ve tümörojenik olmayan meme epitelyal MCF10A hücrelerindeki apoptoz etkisi TUNEL yöntemi kullanılarak gösterilmiştir.

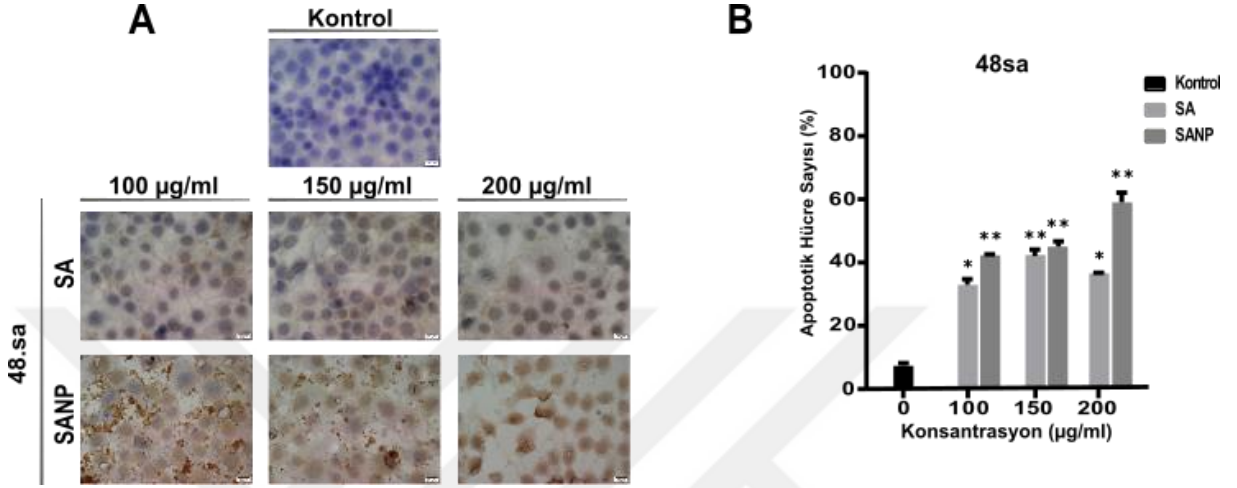
100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda Sa ve SaNP ile 24 saat muamele edilen MCF-7 insan meme kanseri hücrelerindeki TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenmiş apoptoza giden hücre sayısı belirlenmiştir (Şekil 4.16A). Kontrol grubu MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenmiş hücre sayısı %6,04 olarak saptanmıştır. 100 µg/ml Sa ile muamele edilen MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenmiş hücre sayısı %33,66 ,150 µg/ml Sa ile muamele edilen hücrelerde %37,28 ve 200 µg/ml Sa uygulanan hücrelerde %46,42 olarak belirlenmiştir. SaNP ile muamele edilen MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde 100 µg/ml SaNP konsantrasyonunda % 44,83, 150 µg/ml konsantrasyonda %39,13 ve 200 µg/ml konsantrasyonda ise %48,80 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.16B).



Şekil 4. 16 (A) Kontrol , Sa ve SaNP ile 24 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x) (B) S Sa ve SaNP'nin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi (24 saat) (**p<0,03).

48 saatlik uygulamalarda kontrol grubu MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenmiş hücre sayısı %8,45 olarak saptanmıştır. 48 saat 100 µg/ml Sa ile muamele edilen MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenen hücre sayısı %33,69, 150 µg/ml Sa ile muamele edilen hücrelerde %41,78 ve 200 µg/ml Sa uygulanan hücrelerde ise %37,06 olarak belirlenmiştir. SaNP

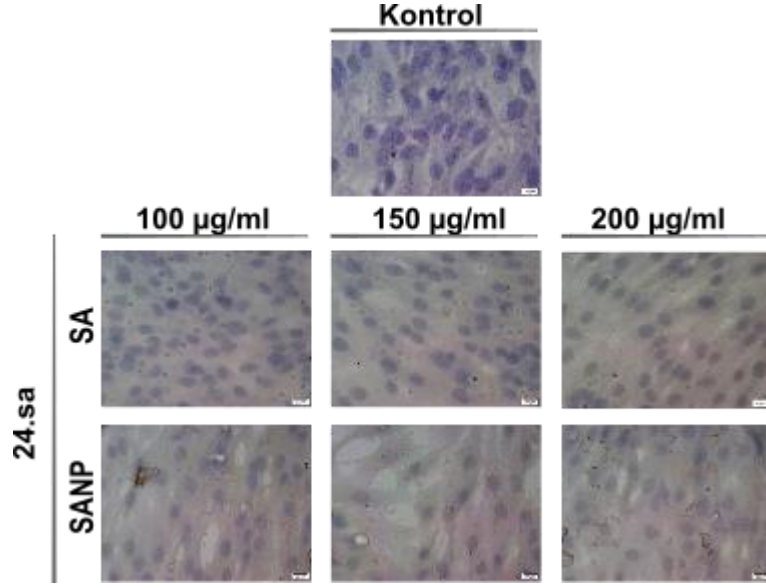
uygulanan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde 100 µg/ml konsantrasyonda TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenen hücre sayısı ise %41,98, 150 µg/ml konsantrasyonda %42,93 ve 200 µg/ml konsantrasyonda ise %58,72 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17B).



Şekil 4. 17 (A) Kontrol, Sa ve SaNP ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x) (B) Sa ve SaNP'nin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi (48 saat) (*p<0,05, **p<0,03).

ANOVA testi sonucunda 24 ve 48 saat muamele edilen 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarındaki Sa ve SaNP'nin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki apoptoz oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir (*p<0,05, **p<0,03).

MCF10A tümörojik olmayan meme epitelyal hücrelerinde 24 saat 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda uygulanan Sa ve SaNP sonucunda TUNEL yöntemi ile pozitif olan hücre sayısında kontrol grubuna göre bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4. 18 Kontrol, Sa ve SaNP ile 24 saat muamele edilen MCF-10A hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)

4.4 Oksidatif Stres ve Antioksidan Çalışmaları

Sa ve SaNP uygulanan MCF-7 hücrelerinden elde edilen lizatlar kullanılarak hücrelerin antioksidan parametreleri (SOD, GSH, CAT) ve lipid peroksidasyonu (MDA) aktiviteleri ölçülmüştür.

4.4.1. Protein Miktar Tayini

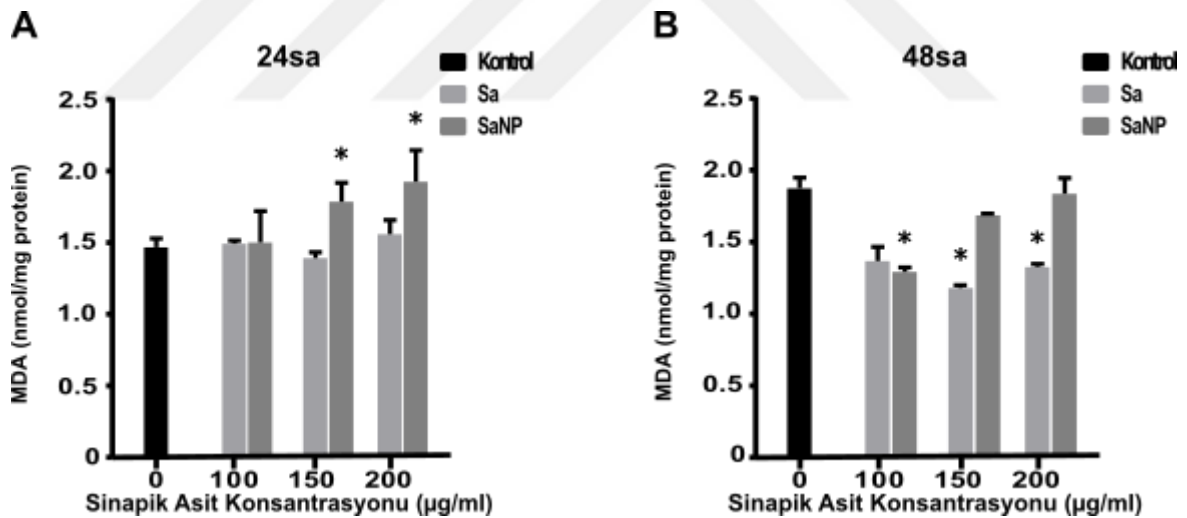
SMART™ BCA Protein Assay Kiti kullanılarak MCF-7 hücrelerinde protein miktar tayini yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında kontrol grubunda ortalama 4,81 mg protein, serbest Sa molekülünün 100 µg/ml, 150 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla; 4,79 mg, 5,62 mg, 4,40 mg protein; optimize SaNP'lerin 100 µg/ml, 150 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla; 5,83 mg, 5,32 mg, 6,07 mg protein bulunmuş ve 48. saatin sonunda ise kontrol grubunda ortalama 6,31 mg protein, serbest Sa molekülünün 100 µg/ml, 150 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla; 6,79 mg, 7,08 mg, 6,11 mg protein ve optimize SaNP'lerin 100 µg/ml, 150 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla; 6,71 mg, 6,44 mg, 6,75 mg protein miktarı tayin edilmiştir.

4.4.2. MDA Aktivitesi

Lipid peroksidasyon belirteci olan MDA seviyesi 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml konsantrasyonlarda Sa ve SaNP ile 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinde elde edilen hücre lizatlarında ölçülmüştür.

24. saatin sonunda kontrol grubu, Sa'nın (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) MCF-7 hücrelerinde MDA seviyeleri sırasıyla 1,47 MDA/mg protein, 1,49 MDA/mg protein, 1,39 MDA/mg protein, 1,56 MDA/mg protein iken, SaNP'nin (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) MCF-7 hücrelerinde MDA seviyeleri sırasıyla 1,50 MDA/mg protein, 1,78 MDA/mg protein, 1,92 MDA/mg protein olarak bulunmuştur (Şekil 4.19A).

MCF-7 hücrelerinde 48. saatlik inkübasyonun sonucunda kontrol ve Sa'nın (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) MDA seviyeleri sırasıyla 1,87 MDA/mg protein, 1,36 MDA/mg protein, 1,18 MDA/mg protein 1,33 MDA/mg protein olarak bulunmuştur. Sa yüklü nanopartikülün (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) MCF-7 hücrelerinde 48 saatte ki MDA seviyeleri sırasıyla 1,29 MDA/mg protein, 1,69 MDA/mg protein, 1,84 MDA/mg protein olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.19B).



Şekil 4. 19 Sa ve SaNP'lerin MCF-7 hücrelerindeki MDA seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat

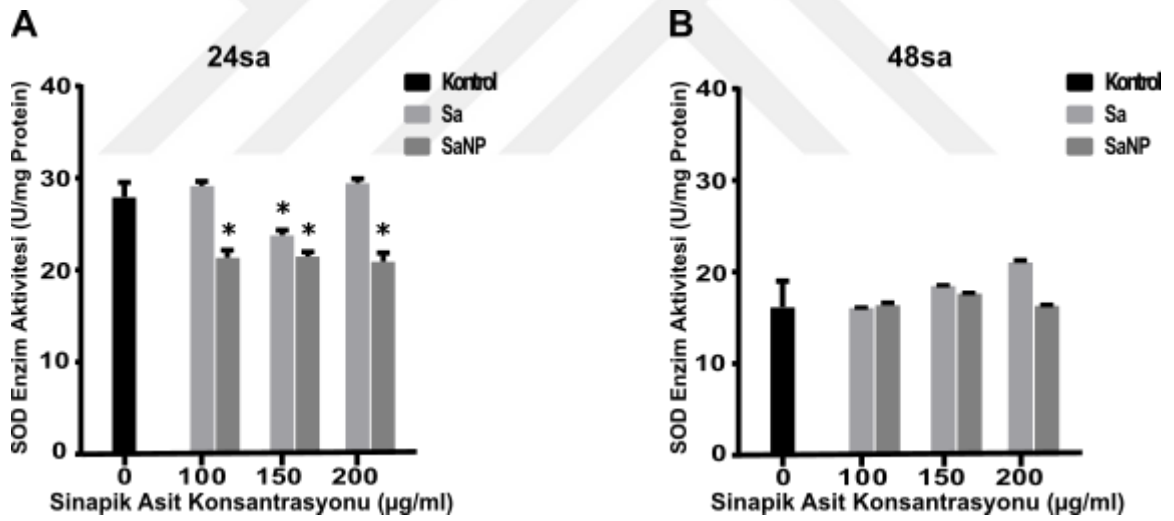
ANOVA testi sonucunda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyelerinde 24 saat muamele edilen SaNP'lerin 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında MCF-7 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). 48 saat Sa 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonunda ve SaNP'nin 100 µg/ml konsantrasyonunda muamelesi sonucunda MCF-7 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre MDA düzeylerinde anlamlı azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.19).

4.4.3. SOD Aktivitesi

100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml konsantrasyonlarda Sa ve SaNP ile 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin SOD aktivitesi elde edilen hücre lizatlarında ölçülmüştür.

Şekil 4.20A'da gösterildiği gibi kontrol, Sa (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) ve SaNP'nin (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinde SOD aktiviteleri sırasıyla 27,0 U/mg protein, 29,5 U/mg protein, 23,4 U/mg protein, 29,8 U/mg protein ve 22,4 U/mg protein, 21,8 U/mg protein, 20,4 U/mg protein olarak bulunmuştur (24 saat).

48 saatlik inkübasyon sonucunda kontrol, Sa (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) ve SaNP'nin (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinde SOD aktiviteleri sırasıyla 16,2 U/mg protein, 16,1 U/mg protein, 18,5 U/mg protein 21,2 U/mg protein ve 18,4 U/mg protein, 17,7 U/mg protein, 16,2 U/mg protein olarak bulunmuştur (Şekil 4.20B).



Şekil 4. 20 Sa ve SaNP'lerin MCF-7 hücrelerindeki SOD enzim aktivitesi (A) 24 saat (B) 48 saat

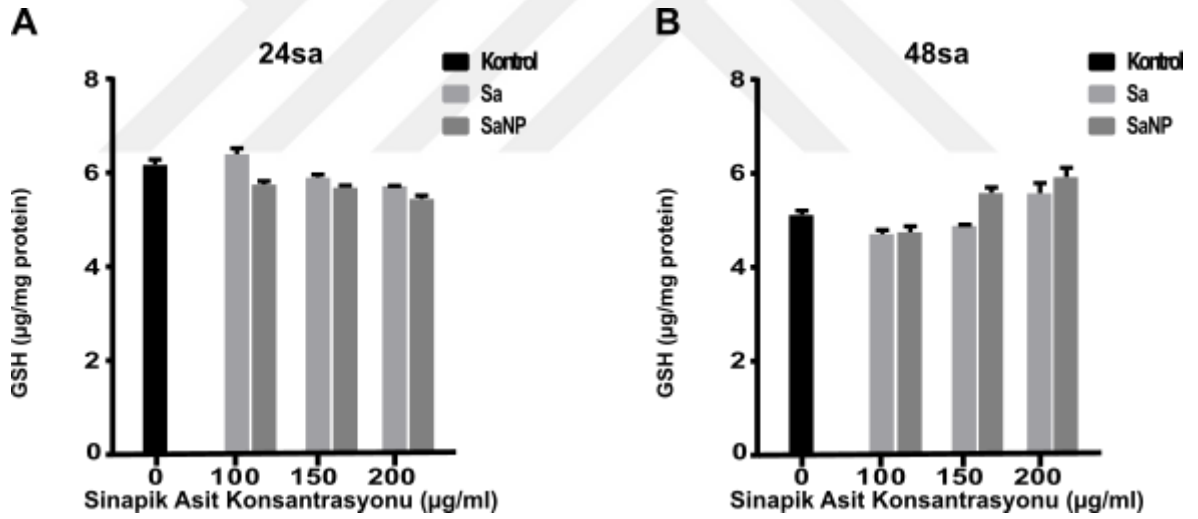
24 saat 150 µg/ml Sa ve SaNP'nin tüm konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerindeki SOD enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.20A).

4.4.4. GSH Aktivitesi

MCF-7 hücrelerinde GSH seviyesi 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml konsantrasyonlarda Sa ve SaNP ile 24 ve 48 saat muamele edilen hücre lizatlarında ölçülmüştür.

24 saatlik inkübasyon sonunda kontrol, Sa (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) ve SaNP'nin (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinde GSH seviyeleri sırasıyla 6,16 µg/mg protein, 6,39 µg/mg protein, 5,89 µg/mg protein, 5,71 µg/mg protein ve 5,75 µg/mg protein, 5,68 µg/mg protein, 5,44 µg/mg protein olarak bulunmuştur (Şekil 4.21A).

48 saatlik inkübasyon sonunda kontrol, Sa (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) ve SaNP'nin (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinde GSH seviyeleri sırasıyla 5,11 µg/mg protein, 4,71 µg/mg protein, 4,88 µg/mg protein, 5,57 µg/mg protein ve 4,74 µg/mg protein, 5,58 µg/mg protein, 5,92 µg/mg protein olarak bulunmuştur (Şekil 4.21B).



Şekil 4. 21 Sa ve SaNP'lerin MCF-7 hücrelerindeki GSH seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat

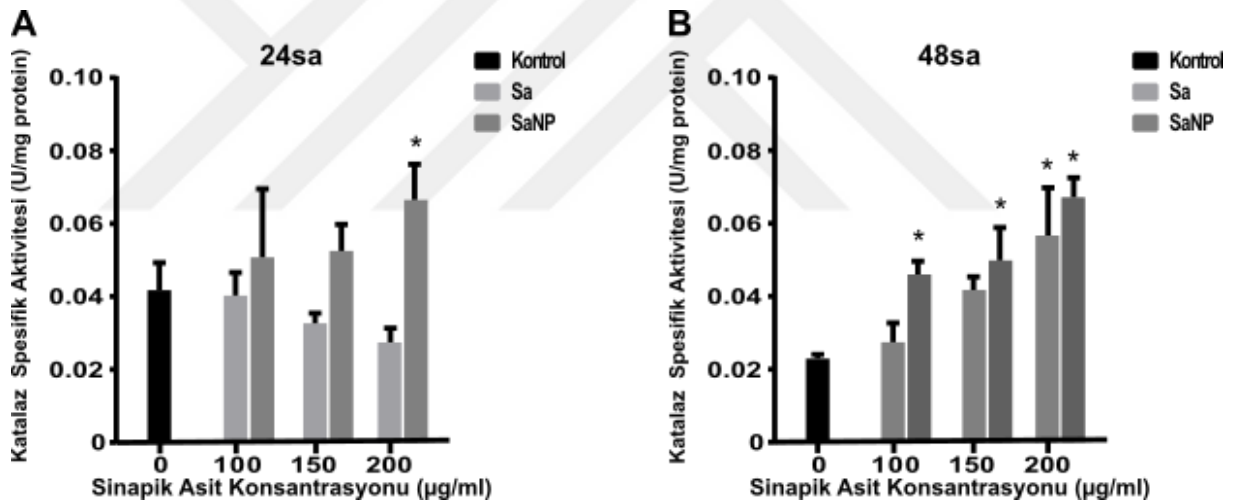
Sa ve SaNP ile muamele edilen tüm konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerindeki GSH seviyelerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fark görülmemiştir (Şekil 4.21).

4.4.5. Katalaz Aktivitesi

100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml konsantrasyonlarda Sa ve SaNP ile 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin katalaz aktivitesi elde edilen hücre lizatlarında ölçülmüştür.

Kontrol, Sa (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) ve SaNP'nin (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) MCF-7 hücrelerinde katalaz aktiviteleri sırasıyla 0,042 U/mg protein, 0,040 U/mg protein, 0,033 U/mg protein, 0,027 U/mg protein ve 0,051 U/mg protein, 0,053 U/mg protein, 0,066 U/mg protein olarak bulunmuştur (24 saat) (Şekil 4.22A).

Kontrol, Sa (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) ve SaNP'nin (100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinde katalaz aktiviteleri sırasıyla 0,023 U/mg protein, 0,027 U/mg protein, 0,042 U/mg protein, 0,057 U/mg protein ve 0,046 U/mg protein, 0,050 U/mg protein, 0,067 U/mg protein olarak bulunmuştur (Şekil 4.22B).



Şekil 4. 22 Sa ve SaNP'lerin MCF-7 hücrelerindeki katalaz aktivitesi (A) 24 saat (B) 48 saat

ANOVA testi sonucunda 24 saat muamele edilen SaNP'lerin 200 µg/ml konsantrasyonunda MCF-7 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre katalaz enzim aktivitesinde anlamlı artış gözlenmiştir (p<0,05). 48 saat Sa'nin 200 µg/ml konsantrasyonunda ve SaNP'nin tüm konsantrasyonlarında MCF-7 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre katalaz enzim aktivitesinde anlamlı artış gözlenmiştir (p<0,05) (Şekil 4.22).

4.5 Öneriler ve Sonuçlar

Geniş spektrumlu farmakolojik özelliklere sahip Sa molekülünün, biyoyararlanımını ve biyoyumumluluğunu arttırmak, biyolojik sistemde daha uzun süre kalmasını sağlamak için deneysel tasarım metodu kullanılarak molekülün nanopartiküler taşıyıcı sistemlere yüklenmesi gerçekleştirilmiştir. SaNP için maksimum enkapsülasyon verimini, minimum partikül boyutunu sağlayan proses parametreleri deneysel tasarım yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Elde edilen optimize sinapik asit yüklü nanopartiküllerin ve sinapik asitin insan meme kanseri MCF-7 ve MCF10A tumerojenik olmayan meme epitelyal hücre hatları üzerinde ki sitotoksik etkisi MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) yöntemi, antiproliferatif etkisi immunositokimyasal olarak PCNA ile apoptotik hücre ölümü ise TUNEL yöntemiyle incelenmiştir. Ayrıca, serbest sinapik asit ve PLGA-Sinapik Asit nanopartiküllerin MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki oksidatif hasara karşı koruyucu/tamir edici etkisi SOD aktivitesi, katalaz aktivitesi, Glutasyon seviyesi, lipit peroksidasyon son ürünü olan Malondialdehit (MDA) seviyesi düzeyleri biyokimyasal olarak analiz edilmiştir.

Bitkilerde yaygın olarak bulunan Sinapik asitin farmakolojik özelliklerini belirlemek ve bu maddenin etki mekanizmasını aydınlatmak için çeşitli *in vitro* / *in vivo* çalışmalar yürütülmüş ve bu çalışmalarla geniş spektrumlu farmakolojik özellikler gösterdiği kanıtlanmıştır (C Balaji, Muthukumaran, & Nalini, 2014; Eroğlu, Avcı, Vural, & Kurar, 2018; Raj et al., 2019). Ancak literatür taramalarında; sinapik asitin pozitif özelliklerinin yanı sıra fizyolojik ortamda düşük çözünürlüğü ve stabilitesi, bu özelliklerinden dolayı biyolojik sistemde zayıf biyoyararlanıma sahip olması bu molekülün farmakolojik olarak kullanım alanını sınırlandığı da belirtilmektedir (Eroğlu et al., 2018).

Fizyolojik ortamda düşük çözünürlüğe ve stabilizeye sahip moleküllerin nanopartiküller sisteme yüklenmesi ile kontrollü ve uzun süre salınım yapabilen bu nanoboyutlu sistemin etken maddenin daha etkili ve daha verimli olarak dağılımının geliştirilmesine yönelik literatürde birçok çalışma bulunmaktadır.

Deneysel tasarım yöntemleri ile sinapik asit yüklü PLGA nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiş ve böylece maksimum enkapsülasyon verimini, minimum partikül boyutunu sağlayan proses parametrelerinin optimize edilmesi sağlanmıştır.

Nanopartiküler sistemlerin hazırlanması tekli emülsiyon (o/w) çözücü uçurma yöntemi ile gerçekleştirilmiş olup karakterizasyon çalışmaları enkapsülasyon etkinliği (EE), boyut (Z-Ave) ve zeta potansiyel (mV) analizleri incelenmiş, ayrıca FT-IR, SEM ve AFM analizleri yapılmıştır.

Optimize nanopartikülü elde edebilmek için farklı parametreler kullanılmış, böylece minimum boyutta, maksimum enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesine sahip partiküllerin üretilmesi hedeflenmiştir. Plackett-Burman deneysel tasarım metoduna göre öncelikle 7 farklı parametrede alt ve üst seviyelerde toplam 8 ve orta seviyede 3 tekrarlı olmak üzere 11 farklı deney yapılmış; enkapsülasyon etkinliği %40,21 ile %73,83 arasında değişirken, boyutlar 141,6 nm ile 1363 nm arasında değişkenlik göstermiştir. Enkapsülasyon etkinliği ve boyuta ait model denklemler incelenerek nanopartikül formülasyonları için en etkili olan üç parametre; karıştırma hızı (Xp7), sonikasyon gücü (Xp3) ve PLGA miktarı (Xp1) olarak belirlenmiştir.

Deneysel tasarımın ikinci aşamasında, Plackett-Burman tarama deneysel tasarım metodu ile seçilen faktörlerin etki ve etkileşimlerini belirlemek için üç faktörlü ve üç seviyeden oluşan Box-Behnken deneysel tasarım metodu ile 17 sentez daha yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde; deney şartlarında sinapik asitin yaklaşık %46 ile %62 arasındaki değerlerde nanopartiküle enkapsüle olduğu, ayrıca elde edilen nanopartiküllerin 145 nm ile 171 nm arasında olduğu belirlenmiştir.

Uygulanan Box Behnken deneysel tasarımı sonucu, enkapsülasyon etkinliği ve nanopartikül boyutu seçilen parametrelerin fonksiyonu olarak modellenmiştir. Geliştirilen model denklemler hata analizi ve ANOVA analizi ile incelenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı (%95 güvenilirlik düzeyinde) oldukları belirlenmiştir. Ayrıca çizilen cevap yüzey grafikleri ile parametrelerin %EE ve nanopartikül boyutu üzerine bireysel ikili etkileri incelenmiştir. Gerek geliştirilen model denklemler gerekse cevap yüzey grafikleri enkapsülasyon etkinliğinin karıştırma hızı ve ayrıca sonikasyon gücü ve PLGA miktarının ikili etkileşimiyle arttığını; boyutun ise tüm ikili etkileşimlerle ciddi oranda arttığını göstermiştir.

Proses parametreleri Design Expert (7.0) programının optimizasyon modülü kullanılarak optimize edilmiş, optimizasyonda enkapsülasyon verimini maksimize eden, nanopartikül boyutunu minimize eden optimum parametreler olarak belirlenmiştir.

Sinapik asit yüklü polimerik nanopartiküller, optimum koşullarda üç tekrarlı olarak sentezlenmiş; yaklaşık %63 enkapsülasyon verimliliğine sahip, ortalama 170 nm boyutunda nanopartiküller elde edilmiştir. Optimize nanopartiküllerin zeta potansiyel değeri ortalama -17,37 mV olarak ve boyut dağılımını belirleyen çoklu dağılım indeksleri 0,185 olarak ölçülmüştür. Merlin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Ferrulik asit yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenmiş ve üretilen nanopartiküllerin boyut analizi sonucunda 200 nm ortalama boyuta sahip oldukları bulunmuştur (Merlin, Prasad, & Shibli, 2012). Gomes ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise; cinnamaldehit molekülü PLGA nanopartiküllere yüklenmiş ve üretilen nanopartiküllerin evaporasyon sonucu boyutlarının 225,3 nm, PDI değerlerinin ise 0,31 olduğu bulunmuştur. Bu proje ekibi tarafından daha önce gerçekleştirilen ve kaffeik asit fenetil ester (Tülin Arasoglu et al., 2015), hesperetin (Duranoğlu, Uzunoglu, Mansuroglu, Arasoglu, & Derman, 2018), quercetin (ARASOĞLU et al., 2017), juglon (T Arasoglu et al., 2017) gibi antioksidan, antimikrobiyal ve antifungal özellikleri olan çeşitli moleküllerin PLGA nanopartiküllere yüklendiği çalışmalarda da farklı proses parametreleri ile gerçekleştirilen sentezlerde farklı boyut sonuçları elde edilmiştir. Deneysel tasarım yöntemi ile hesperetin yüklü PLGA nanopartiküllerin üretildiği çalışmamızda da benzer şekilde optimize nanopartiküller 260,2 nm boyutta sentezlenmiştir (Duranoğlu et al., 2018).

Optimize nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği, boyut ve çoklu dağılım indeksi analizlerinden sonra detaylı karakterizasyon işlemlerine geçilmiştir. Bu amaçla nanopartiküllerin sentezinde sinapik asit ile etkileşimlerinin olup olmadığı, yada sinapik asitin nanopartiküllere yüzey adsorpsiyonu varlığında/yokluğunda yüklendiği hakkında bilgi almak için FT-IR analizleri gerçekleştirilmiştir. FT-IR analizleri serbest sinapik asit ve PLGA polimeri ile karşılaştırmalı olarak yapılmıştır. Gerçekleştirilen FT-IR analizi sonucunda elde edilen spektrumlar incelendiğinde sinapik asitin karakteristik gerilme ve eğilme titreşimlerine ait piklerinin nanopartiküllere ait FT-IR spektrumunda olmadığı görülmektedir. Bu sonuç sinapik asitin yüzey adsorpsiyonu olmaksızın nanopartiküllerin içerisine başarı ile yüklendiğini göstermektedir.

FT-IR analizi sonrasında üretilen optimize nanopartiküllerin morfolojik incelemesi SEM cihazı ile yapılan görüntüleme sonrasında gerçekleştirilmiştir. Üretilen

nanopartiküllerin SEM mikrografları incelendiğinde sentezlenen nanopartiküllerin küresel morfolojide ve pürüzsüz yüzel özelliklerinde ve homojen boyut dağılımlı oldukları görülmektedir. Buna ek olarak, nanopartiküllere ait SEM görüntüsünün ölçeklendirilmesi ile elde edilen boyut sonuçlarının dinamik ışık saçılması ile elde edilen hidrodinamik çap ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Karakterizasyon çalışmalarının ardından üretilen nanopartiküllerin *in vitro* ortamda sinapik asit molekülünü salım davranışı incelenmiştir. Zamana karşı çizilen kümülatif salım grafiği incelendiğinde üretilen nanopartiküllerin kontrollü salım ile 60 günün sonunda sinapik asitin %68,75'ini saldıgı tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında optimum şartlarda üretilmiş nanopartikül formülasyonunun *in vitro* olarak MCF-7 insan meme kanseri ve MCF10A tumerojenik olmayan meme epitelyal hücre hatları üzerinde ki sitotoksik etkisinin olup olmadığının serbest sinapik asit molekülü ile karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda (0-1000 µg/ml) Sa ve SaNP ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde 24 saat inkübasyon sonrasında Sa molekülü bu konsantrasyon aralığında çok düşük sitotoksik etki gösterirken, SaNP uygulamasının ise 100 µg/ml ve üzerinde ki konsantrasyonlarda hücreleri inhibe etmeye başladığı görülmektedir (Şekil 4.8). 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında ise SaNP ile muamele edilen MCF 7 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin devam ettiği görülmektedir (Şekil 4.9 ve 4.10). Sa molekülünün MCF-7 ve MDA-MB231 hücrelerinin üzerinde sitotoksik etkisinin değerlendirildiği 2019 yılına ait bir çalışmada; 100 µg/ml Sa konsantrasyonuna kadar toksik aktivitenin olmadığı bildirilmiş ve daha yüksek Sa konsantrasyonlarında çalışılması önerilmiştir (Raj et al., 2019). Sinapik asitin 8 farklı türevleri (4 µM konsantrasyonda) ile gerçekleştirilen bir çalışmada MCF-7 hücrelerini %12-98 arasında inhibe ettiğini raporlamışlardır (Imai, Yokoe, Tsubuki, & Takahashi, 2019). Chandrasekaran ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada HT29 ve SW480 hücre hatlarında Sa molekülünün sitotoksik etkisini değerlendirmişlerdir. Sa ile muamele edilen HT29 ve SW480 hücre hatlarında 24 saat inkübasyon sonrasında IC₅₀ değerleri sırasıyla 138,11µg, 112,55 µg 48 saat inkübasyon sonrasında ise sırasıyla 111,91 µg ve 98 µg bulmuşlardır(Chandrasekaran Balaji, Muthukumar, Vinothkumar, & Nalini, 2014). Başka bir çalışmada ise Sa ile muamele edilen caco 2 hücrelerinin 72 saat inkübasyon

sonrasında IC₅₀ değeri 4,0-5,0 mM arasında etkili olduğu gösterilmiştir(Ekmekcioglu, Feyertag, & Marktl, 1998). Hameed ve arkadaşları, Sa'nin hamster akciğer fibroblast hücresi V79 ve insan serviks kanser hücresi HeLa üzerinde sinapik asitin sitotoksik özelliklerini incelediğinde IC₅₀ değerlerini sırasıyla 1860 µM ve 7248 µM olarak bulmuşlardır(Hameed, Aydın, Başaran, & Başaran).

MCF10A hücre hattında 24 ve 48 saatlerde farklı konsantrasyonlarda Sa ve SaNP'lerin toksik etki göstermediği görülmüştür (Şekil 4.11-4.12). Sa molekülünün sağlıklı hücre hatları ile gerçekleştirilmiş toksisite çalışmalarında genel olarak toksik etki yaratmadığı literatürde ifade edilmektedir. Sa molekülünün trimer ve tetramer yapıdaki farklı türevleri ile hücre proliferasyonunun incelendiği Baltas ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada MCF-7 ve MCF10A hücre hatlarında Sa bileşiklerinin etkilerine bakılmış, tumorejenik olmayan MCF10A hücrelerinde moleküllerin toksik etki göstermediği belirtilmiştir(P. De, Baltas, & Bedos-Belval, 2011). Reddy ve arkadaşları, sağlığa yararlı olan polifenolik bileşiklerin sağlıklı hücrelerde toksik etki yaratmazken kanser hücre hatlarında toksit etki yapabileğini ifade etmektedirler(Reddy & Prasad, 2011).

Kanser tanı ve tedavisinde marker olarak kullanılan PCNA, hücre bölünmesi ile korelasyon göstererek hücrenin proliferasyon düzeyini işaret etmektedir(Balajee, Dianova, & Bohr, 1999; Tsurimoto, 2006). Quercetin, hesperetin ve kafeikasitfenilester (CAPE) gibi biyoaktif bileşiklerin ve bunların nanopartikül formülizasyonlarının MCF-7, C6 glioma, coco-2 gibi çeşitli kanser hücre hatlarında PCNA hücre proliferasyonunu inhibe ettiği yapılan çalışmalarda yer almaktadır(Aranganathan & Nalini, 2013; Ersoz et al., 2019). Çalışmamızda ise ilk kez tarafımızca Sa ve SaNP ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında PCNA hücre proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı Şekil 4.13 (24 saat) ve Şekil 4.14'de (48 saat) tespit edilmiştir.

Apoptotik hücre çekirdeğinin spesifik boyanmasıyla hücre ölümünün tespitinine dayalı TUNEL yönteminde Sa ve SaNP ile muamelesinin MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri Şekil 4.16 (24 saat) ve 17'de (48 saat) gösterilmektedir. 24 saat inkübasyon sonrasında kontrol hücrelerine kıyasla MCF-7 hücrelerinde Sa'nın 200 µg/ml konsantrasyonunda apoptoza giden hücre sayısında yaklaşık olarak 7 kat artış gözlenirken, aynı artış SaNP'nin 100 µg/ml konsantrasyonunda gözlenmiştir (Şekil

4.16). 48 saat inkübasyonda ise kontrol hücrelerine kıyasla MCF-7 hücrelerinin 150 µg/ml Sa konsantrasyonunda apoptoza giden hücre sayısında yaklaşık olarak 5 kat artış gözlenirken, bu artış SaNP'nin 100 µg/ml konsantrasyonunda gözlenmiştir (Şekil 4.17.B). Sinapik asitin dahil olduğu fenolik bileşikler grubu, hücrenin sinyal yollarını modüle ederek, hücre ölüm sinyallerini etkinleştirdiği ve preneoplastik veya neoplastik hücrelerde apoptosisi başlatığı, böylece kanser gelişimini ve ilerlemesini inhibe ettiği belirtilmiştir(Fresco, Borges, Diniz, & Marques, 2006). Sinapik asit içeren fenoliklerin farklı konsantrasyonlarda ve inkübasyon sürelerinde T47D insan göğüs kanseri hücreleri üzerinde anti-proliferatif ve apoptotik etki gösterdiği bildirilmiştir(Kampa et al., 2004).

Çalışmamızda, Sa molekülünün PLGA nanopartikül sistemine yüklenmesi ile oluşan SaNP'nin daha düşük konsantrasyonda MCF-7 hücrelerinde apoptotik etki göstererek serbest moleküle göre daha etkin olduğu ortaya çıkarılmıştır.Yallapu ve arkadaşları kürkimin yüklü PLGA nanopartikülerin over ve matastatik kanser hücre hatlarında serbest kürkimine göre hücre sel alımı arttırarak apoptozu desteklediğini ifade etmektedirler(Yallapu, Gupta, Jaggi, & Chauhan, 2010). Başka bir çalışmada ise 5-fluorourasil (5-FU)-yüklü PLGA nanopartikülerin zamana ve doza bağımlı olarak serbest moleküle göre apoptoz üzerine daha etkili olduğunu ortaya koyulmuştur(Nair, Jagadeeshan, Nair, & Kumar, 2011). Tüm bu çalışmalar, antioksidan özelliklere sahip biyoaktif moleküllerin nanopartikül sistemlere yüklenmesi sonucunda biyoyararlanımının arttığını ve bunun sonucunda da kanser hücrelerinde apoptozu etkili bir şekilde tetiklediğini göstermektedir.

Son yıllarda antioksidanlar oksidatif hasara bağlı hastalıkları önleme/tedavi sürecinde sıklıkla kullanılmaktadır(Morry, Ngamcherdrakul, & Yantasee, 2017). Monofenolik bir yapıya sahip olan sinapik asit molekülü yapısında bulunan hidroksil grubu sayesinde elektron alıp verebilmekte ve oksitleyici/redükleyici etki gösterebilmektedir. Bu özelliği ile molekül antioksidan etki göstermekte ve oksidatif hasara bağlı hastalıkları önlemede önemli bir rol oynamaktadır(Cuvelier, Richard, & Berset, 1992). Reaktif oksijen türlerinin üretimindeki yükselişle birlikte meydana gelen oksidatif stresdeki artış kansere neden olmaktadır. Geniş bir metabolik aktivitesi olan sinapik asitin antioksidan özelliğinin yanı sıra, pro-oksidant etkisiyle göstererek ROS oluşumunu tetikleyerek apoptozda DNA fragmantasyon oluşumuna aracılık ettiği bildirilmiştir. Sinapik asitin

henüz aydınlanmamış farklı antioksidan mekanizmaları da mevcut olduğu literatürde yer almaktadır(P. De et al., 2011).

Çalışmamızda; 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda 24 saat SaNP ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde MDA seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (*p<0,05). Hücrelerde ROS seviyesinin artması apoptozise giden yolların aktifleşmesini sağlamaktadır. Uygulanan bu dozlar SaNP'lerin ROS oluşumunu tetikleyerek hücreleri apotoza yönlendirdiği TUNEL sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

Antioksidan bir enzim olan SOD aktivitesi SaNP'lerin tüm konsantrasyonlarında MCF-7 hücreleri üzerinde kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (24 saat). SOD enzim aktivitesinin azalması hücrede serbest radikal seviyesinin artmasına ve böylelikle hücrenin apoptozise yönelmesine neden olmaktadır. Çalışmadaki SaNP uygulanan MCF-7 hücrelerinde ki MDA seviyelerindeki artış, SOD enzim aktivitesindeki azalışla uyumludur. Yapılan *in vitro* çalışmalarda kanser hücrelerinde artan ROS seviyesine cevap olarak SOD ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin seviyesinde azalış olduğu bildirilmektedir(Chandrasekaran Balaji et al., 2014). Serbest radikal aracılı bir işlem olan lipid peroksidasyonunda hücre içi ROS seviyelerinin artması sonucunda biyolojik membranların bozulduğu ve bu durumun sitotoksiteye neden olduğu da bilinmektedir(Halliwell, 1989). Daha önce yapılan *In vitro* antikanser çalışmalarda primer kanser hücrelerinde bulunan ürünler tarafından artan ROS seviyelerinin ve lipid peroksidasyonunun, SOD ve CAT gibi antioksidanların azalması ile ilişkili olduğunu ortaya koyulmuştur (Skrzydowska et al., 2005). Ancak, 48 saatlik inkübasyon sonrası aynı dozlarda SaNP uygulanan hücrelerde kontrole göre anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.

Oksidatif strese karşı cevap olarak gelişen ve indirgeyici bir ajan olan GSH'nin seviyesi Sa ve SaNP'nin uygulanan dozlarında 24 saatte MCF-7 hücrelerinde kontrole göre bir istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalış gözlemlenirken, 48 saatte 150-200 µg/ml SaNP uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine göre anlamsız artış saptanmıştır. Uygulanan SaNP konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerinde artan GSH seviyesi hücrenin redoks durumunu koruyarak hücre sinyal mekanizmasında apoptozise yönlendirmesi ile antioksidan etkinliğini ortaya koymuştur. Literatürde de kanser

hücrelerinde ROS seviyesinde ki artış intraselüler GSH seviyesinde azalışa neden olduğu bildirilmektedir(Chandrasekaran Balaji et al., 2014).

ROS'un oluşturduğu hasara karşı antioksidan savunma sistemlerinden biri olan katalaz enzimi seviyesinde SaNP uygulanan tüm konsantrasyonlarda 48 saate MCF-7 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı artış gözlenmiştir (Şekil 4.22B) ($p<0,05$).

Sinapik asit molekülünün deneysel metod yöntemleri kullanılarak nanopartiküler sistemlere yüklenmesi ile MCF-7 meme kanser hücrelerinde biyoyararlanımının artırılması hedeflenmiştir. Deneysel metod kullanılarak oluşturulan optimize nanopartiküllerin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde serbest moleküle kıyasla daha düşük dozlarda daha yüksek antiproliferatif ve apoptotik etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Ayrıca, hazırlanan SaNP'lerin MCF-7 hücrelerinde sahip olduğu yüksek antioksidan aktivitesi ile serbest radikallerin ortadan kaldırılmasına katkıda bulunarak kanser hücrelerinin çoğalmasını önlemiştir. Bu optimize sinapik asit yüklü nanopartiküllerin MCF-10A tumerojenik olmayan meme epitelyal hücre hattı üzerinde toksik bir etki yaratmaması ve MCF-7 meme kanser hücreleri üzerinde inhibe edici etki yaratması açısından da önemlidir. Bu çalışmada elde edilen bulgular polifenolik bileşiklerin nanopartikül formülasyonlarının oluşturulması ile tedaviye yönelik ilaç tasarımlarının yapılmasına katkı sağlayabilir. Ayrıca, bu araştırma sonuçlarının daha sonraki *In vivo* deneylerle zenginleştirilebileceği önerilmektedir.

- Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., . . . Suleria, H. A. R. (2017). Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1689-1699.
- Akyol, Ö. (2004). Şizofrenide oksidatif stres. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5, 15-25.
- Antony, J. (2014). *Design of experiments for engineers and scientists*: Elsevier.
- Aranganathan, S., & Nalini, N. (2013). Antiproliferative efficacy of hesperetin (citrus flavanoid) in 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Phytotherapy Research*, 27(7), 999-1005.
- Arasoglu, T., Derman, S., & Mansuroglu, B. (2015). Comparative evaluation of antibacterial activity of caffeic acid phenethyl ester and PLGA nanoparticle formulation by different methods. *Nanotechnology*, 27(2), 025103.
- Arasoglu, T., Derman, S., Mansuroglu, B., Yelkenci, G., Kocyigit, B., Gumus, B., . . . Kocacaliskan, I. (2017). Synthesis, characterization and antibacterial activity of juglone encapsulated PLGA nanoparticles. *Journal of applied microbiology*, 123(6), 1407-1419.
- ARASOĞLU, T., Derman, S., MANSUROĞLU, B., UZUNOĞLU, D., KOÇYİĞİT, B. S., GÜMÜŞ, B., . . . Tuncer, B. (2017). Preparation, characterization, and enhanced antimicrobial activity: quercetin-loaded PLGA nanoparticles against foodborne pathogens. *Turkish Journal of Biology*, 41(1), 127-140.
- ASLANKOÇ, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., . . . Yılmaz, B. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 362-369.
- Aust, S. D. (1994). Thiobarbituric acid assay reactants. *Methods in Toxicology*, 1, 367-376.
- Ayyoob, M., & Kim, Y. J. (2018). Effect of Chemical Composition Variant and Oxygen Plasma Treatments on the Wettability of PLGA Thin Films, Synthesized by Direct Copolycondensation. *Polymers*, 10(10), 1132.
- Balajee, A. S., Dianova, I., & Bohr, V. A. (1999). Oxidative damage-induced PCNA complex formation is efficient in xeroderma pigmentosum group A but reduced in Cockayne syndrome group B cells. *Nucleic acids research*, 27(22), 4476-4482.
- Balaji, C. (2014). Evaluation of biochemical, historical and molecular markers to validate the colon chemopreventive potential of sinapic acid: an in vitro and in vivo approach.

- Balaji, C., Muthukumar, J., & Nalini, N. (2014). Chemopreventive effect of sinapic acid on 1, 2-dimethylhydrazine-induced experimental rat colon carcinogenesis. *Human & experimental toxicology*, 33(12), 1253-1268.
- Balaji, C., Muthukumar, J., Vinothkumar, R., & Nalini, N. (2014). Anticancer effects of sinapic acid on human colon cancer cell lines HT-29 and SW480. *Int J Pharm Biol Arch*, 5(3), 176-183.
- Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints *Cell Cycle Control* (pp. 29-40): Springer.
- Bates, S., & Vousden, K. (1999). Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(1), 28-37.
- BAYIR, A. G., AKSOY, A. N., & KOÇYİĞİT, A. (2019). The Importance of Polyphenols as Functional Food in Health. *Bezmialem Science*, 7(2), 157-164.
- Berridge, M., Tan, A., McCoy, K., & Wang, R. (1996). The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That. *That use*.
- Bhatia, S. (2016). Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications *Natural polymer drug delivery systems* (pp. 33-93): Springer.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19.
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91(2), 179-194.
- Boehm, E. M., Powers, K. T., Kondratyck, C. M., Spies, M., Houtman, J. C., & Washington, M. T. (2016). The proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-interacting protein (PIP) motif of DNA polymerase η mediates its interaction with the C-terminal domain of Rev1. *Journal of Biological Chemistry*, 291(16), 8735-8744.
- Bolhassani, A., Javanzad, S., Saleh, T., Hashemi, M., Aghasadeghi, M. R., & Sadat, S. M. (2014). Polymeric nanoparticles: potent vectors for vaccine delivery targeting cancer and infectious diseases. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(2), 321-332.
- Bowden, G. D., Pichler, B. J., & Maurer, A. (2019). A Design of Experiments (DoE) Approach Accelerates the Optimization of Copper-Mediated 18 F-Fluorination Reactions of Arylstannanes. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant*: John Wiley & Sons.
- Chalas, J., Claise, C., Edeas, M., Messaoudi, C., Vergnes, L., Abella, A., & Lindenbaum, A. (2001). Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 55(1), 54-60.
- Chan, S. R., & Blackburn, E. H. (2004). Telomeres and telomerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1441), 109-122.

- Chen, C. (2016). Sinapic acid and its derivatives as medicine in oxidative stress-induced diseases and aging. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Cho, K., Wang, X., Nie, S., & Shin, D. M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical cancer research*, 14(5), 1310-1316.
- Christoforidis, J. B., Chang, S., Jiang, A., Wang, J., & Cebulla, C. M. (2012). Intravitreal devices for the treatment of vitreous inflammation. *Mediators of inflammation*, 2012.
- Cos, P., Rajan, P., Vedernikova, I., Calomme, M., Pieters, L., Vlietinck, A. J., . . . Berghe, D. V. (2002). In vitro antioxidant profile of phenolic acid derivatives. *Free radical research*, 36(6), 711-716.
- Coşkun, G., & Özgür, H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145-158.
- Cuvelier, M.-E., Richard, H., & Berset, C. (1992). Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(2), 324-325.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), 348.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Pr at, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release*, 161(2), 505-522.
- Darzynkiewicz, Z., Galkowski, D., & Zhao, H. (2008). Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*, 44(3), 250-254.
- De, A., Kuppaswamy, G., & Jaiswal, A. (2019). Implementation of two different experimental designs for screening and optimization of process parameters for metformin-loaded carboxymethyl chitosan formulation. *Drug development and industrial pharmacy*, 45(11), 1821-1834.
- De, P., Baltas, M., & Bedos-Belval, F. (2011). Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-a review. *Current medicinal chemistry*, 18(11), 1672-1703.
- Derman, S., Kızılbey, K., & Akdeste, Z. M. (2013). Polymeric nanoparticles. *Sigma*, 31, 107-120.
- Dilsiz, N. (2009). *Moleküler biyoloji*: Palme Yayıncılık.
- Duranoğlu, D., Uzunoglu, D., Mansuroglu, B., Arasoglu, T., & Derman, S. (2018). Synthesis of hesperetin-loaded PLGA nanoparticles by two different experimental design methods and biological evaluation of optimized nanoparticles. *Nanotechnology*, 29(39), 395603.
- Ekmekcioglu, C., Feyertag, J., & Marktl, W. (1998). Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. *Cancer letters*, 128(2), 137-144.
- Eroğlu, C., Avcı, E., Vural, H., & Kurar, E. (2018). Anticancer mechanism of Sinapic acid in PC-3 and LNCaP human prostate cancer cell lines. *Gene*, 671, 127-134.

- Ersoz, M., Erdemir, A., Duranoglu, D., Uzunoglu, D., Arasoglu, T., Derman, S., & Mansuroglu, B. (2019). Comparative evaluation of hesperetin loaded nanoparticles for anticancer activity against C6 glioma cancer cells. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 319-329.
- Fiskum, G. (1996). *Neurodegenerative Diseases: Molecular and Cellular Mechanisms and Therapeutic Advances*: Springer Science & Business Media.
- Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., & Marques, M. (2006). New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal research reviews*, 26(6), 747-766.
- Fukuda, I. M., Pinto, C. F. F., Moreira, C. d. S., Saviano, A. M., & Lourenço, F. R. (2018). Design of Experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical Quality by Design (QbD). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(SPE).
- Gaspar, A., Martins, M., Silva, P., Garrido, E. M., Garrido, J., Firuzi, O., . . . Borges, F. (2010). Dietary phenolic acids and derivatives. Evaluation of the antioxidant activity of sinapic acid and its alkyl esters. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(21), 11273-11280.
- Gawęł, S., Wardas, M., Niedworok, E., & Wardas, P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomości lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 57(9-10), 453.
- Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., & Hatton, P. V. (2014). An overview of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *International journal of molecular sciences*, 15(3), 3640-3659.
- Goleniowski, M., Bonfill, M., & Cusido, R. Phenolic Acids 63.
- Halliwell, B. (1989). Lipid peroxidation: a radical chain reaction. *Free radicals in biology and medicine*.
- HAMEED, H. (2014). *Evaluation Of Cytotoxic And Genotoxic Properties Of Sinapic Acid* (Master of Science), Republic Of Turkey Hacettepe University.
- Hameed, H., Aydin, S., Başaran, A. A., & Başaran, N. (2016). Assessment of cytotoxic properties of sinapic acid in vitro. *Turk. J. Pharm. Sci*, 13(2), 225-232.
- Hameed, H., Aydın, S., Başaran, A. A., & Başaran, N. Sinapik Asitin Sitotoksik Özelliklerinin İn Vitro İncelenmesi.
- Hathout, Y., Gehrmann, M. L., Chertov, A., & Fenselau, C. (2004). Proteomic phenotyping: metastatic and invasive breast cancer. *Cancer letters*, 210(2), 245-253.
- Heck, D. E., Shakarjian, M., Kim, H. D., Laskin, J. D., & Vetrano, A. M. (2010). Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1203, 120.
- Hudson, E. A., Dinh, P. A., Kokubun, T., Simmonds, M. S., & Gescher, A. (2000). Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 9(11), 1163-1170.

- Imai, M., Yokoe, H., Tsubuki, M., & Takahashi, N. (2019). Growth inhibition of human breast and prostate cancer cells by cinnamic acid derivatives and their mechanism of action. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, b18-01002.
- Imbalzano, K. M., Tatarkova, I., Imbalzano, A. N., & Nickerson, J. A. (2009). Increasingly transformed MCF-10A cells have a progressively tumor-like phenotype in three-dimensional basement membrane culture. *Cancer cell international*, 9(1), 1-11.
- Institute, N. H. G. R. Cell Cycle. Retrieved 04.04.2020
- Jarai, B. M., Kolewe, E. L., Stillman, Z. S., Raman, N., & Fromen, C. A. (2020). Polymeric Nanoparticles *Nanoparticles for Biomedical Applications* (pp. 303-324): Elsevier.
- Johnson, M., Dahiya, J., Olkowski, A., & Classen, H. (2008). The effect of dietary sinapic acid (4-hydroxy-3, 5-dimethoxy-cinnamic acid) on gastrointestinal tract microbial fermentation, nutrient utilization, and egg quality in laying hens. *Poultry science*, 87(5), 958-963.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O., Aytakin, Y., & Solakoğlu, S. (1993). *Temel histoloji*: Barış Kitabevi.
- Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., & Farokhzad, O. C. (2016). Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. *Chemical reviews*, 116(4), 2602-2663.
- Kampa, M., Alexaki, V.-I., Notas, G., Nifli, A.-P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., . . . Boskou, D. (2004). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Research*, 6(2), R63.
- Kanchana, G., Shyni, W. J., Rajadurai, M., & Periasamy, R. (2011). Evaluation of antihyperglycemic effect of sinapic acid in normal and streptozotocin-induced diabetes in albino rats. *Global Journal of Pharmacology*, 5(1), 33-39.
- KARABULUT, H., & GÜLAY, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76.
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931.
- Kitamoto, M., Nakanishi, T., Kira, S., Kawaguchi, M., Nakashio, R., Suemori, S., . . . Dohi, K. (1993). The assessment of proliferating cell nuclear antigen immunohistochemical staining in small hepatocellular carcinoma and its relationship to histologic characteristics and prognosis. *Cancer*, 72(6), 1859-1865.
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30(6), 620-650.
- Krishnaswamy, K., & Orsat, V. (2017). Sustainable delivery systems through green nanotechnology *Nano-and Microscale Drug Delivery Systems* (pp. 17-32): Elsevier.

- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E., . . . Green, D. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death & differentiation*, *16*(1), 3-11.
- Kubben, F., Peeters-Haesevoets, A., Engels, L., Baeten, C., Schutte, B., Arends, J., . . . Blijham, G. (1994). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation. *Gut*, *35*(4), 530-535.
- Leardi, R. (2013). Experimental design *Data Handling in Science and Technology* (Vol. 28, pp. 9-53): Elsevier.
- Lee, A. V., Oesterreich, S., & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 cells—changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *107*(7).
- Lee, H. E., Kim, D. H., Park, S. J., Kim, J. M., Lee, Y. W., Jung, J. M., . . . Cai, M. (2012). Neuroprotective effect of sinapic acid in a mouse model of amyloid β 1–42 protein-induced Alzheimer's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *103*(2), 260-266.
- Lüleyap, H. Ü. (2008). *Moleküler genetiğin esasları*: Nobel Kitabevi.
- Maga, G., & Hübscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of cell science*, *116*(15), 3051-3060.
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, *3*(3), 1377-1397.
- Merlin, J. J., Prasad, N. R., & Shibli, S. (2012). Ferulic acid loaded poly-d, l-lactide-co-glycolide nanoparticles: systematic study of particle size, drug encapsulation efficiency and anticancer effect in non-small cell lung carcinoma cell line in vitro. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, *2*(1), 69-76.
- Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in medical sciences*, *63*(1), 68-78.
- Morry, J., Ngamcherdtrakul, W., & Yantasee, W. (2017). Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. *Redox biology*, *11*, 240-253.
- Murray, C., Norris, D. J., & Bawendi, M. G. (1993). Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E= sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *Journal of the American Chemical Society*, *115*(19), 8706-8715.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *cell*, *88*(3), 355-365.
- Nair, L., Jagadeeshan, S., Nair, S. A., & Kumar, G. V. (2011). Biological evaluation of 5-fluorouracil nanoparticles for cancer chemotherapy and its dependence on the carrier, PLGA. *International journal of nanomedicine*, *6*, 1685.
- Nićiforović, N., & Abramović, H. (2014). Sinapic acid and its derivatives: natural sources and bioactivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(1), 34-51.

- Nimesh, S. (2013). Poly (D, L-lactide-co-glycolide)-based nanoparticles. *Woodhead Publishing series in biomedicine, gene therapy*. Woodhead Publishing, Sawston, 309-329.
- Niwa, T., Doi, U., Kato, Y., & Osawa, T. (1999). Inhibitory mechanism of sinapinic acid against peroxynitrite-mediated tyrosine nitration of protein in vitro. *FEBS letters*, 459(1), 43-46.
- Niwa, T., Kato, Y., & Osawa, T. (1999). Inhibitory mechanism of sinapinic acid against peroxynitrite-mediated tyrosine nitration of protein in vitro. *FEBS letters*, 459(1), 43-46.
- No, A., & Committee, A. M. (2013). Experimental design and optimisation (4): Plackett–Burman designs. *Analytical Methods*, 5(8), 1901-1903.
- Öktem, S., Özhan, M. H., & Özol, D. (2001). Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2(1), 91-95.
- Packer, L. (2001). *Handbook of antioxidants*: CRC Press.
- Parl, F. F. (2014). *The Etiology of Breast Cancer: Endogenous and Exogenous Causes*: Fritz F. Parl; 1st edition (March 20, 2014).
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30(1), 11-26.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603.
- Raj, D. P., Shairam, M., Suganya, N., Hootan, R., Kartik, R., Pierre, K., . . . Rajalakshmi, S. (2019). Green synthesis of copper oxide nanoparticles using sinapic acid: an underpinning step towards antiangiogenic therapy for breast cancer. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*.
- Ratnam, D. V., Ankola, D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., & Kumar, M. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of controlled release*, 113(3), 189-207.
- Razavi, M. (2017). *Biomaterials for tissue engineering* (Vol. 4): Bentham Science Publishers.
- Reddy, B. V., & Prasad, N. R. (2011). 2-deoxy-D-glucose combined with ferulic acid enhances radiation response in non-small cell lung carcinoma cells. *Central European Journal of Biology*, 6(5), 743.
- Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Jackson, R. B. (2014). *Campbell biology*: Pearson Boston, MA.
- Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *The American journal of pathology*, 157(5), 1415-1430.
- Roy, S. J., & Prince, P. S. M. (2012). Protective effects of sinapic acid on lysosomal dysfunction in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. *Food and chemical toxicology*, 50(11), 3984-3989.

- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 215S-217S.
- Sinha, A. S., Khandavilli, U. R., O'Connor, E. L., Deadman, B. J., Maguire, A. R., & Lawrence, S. E. (2015). Novel co-crystals of the nutraceutical sinapic acid. *CrystEngComm*, 17(26), 4832-4841.
- Skrzydłewska, E., Sulkowski, S., Koda, M., Zalewski, B., Kanczuga-Koda, L., & Sulkowska, M. (2005). Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 11(3), 403.
- Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2011). *TNM classification of malignant tumours*: John Wiley & Sons.
- Soule, H., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the national cancer institute*, 51(5), 1409-1416.
- Sun, Y., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34(3), 497-500.
- Tiwari, J. N., Tiwari, R. N., & Kim, K. S. (2012). Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science*, 57(4), 724-803.
- TOMATIR, A. G. (2003). Apoptoz: programlı hücre ölümü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 23(6), 499-508.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- Tsurimoto, T. (2006). PCNA-interacting proteins. *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)*. H. Lee (ed). Kerala: Research Signpost, 25-49.
- Vardhan, H., Mittal, P., Adena, S. K. R., & Mishra, B. (2017). Long-circulating polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate nanoparticles for tumor targeted docetaxel delivery: formulation, optimization and in vitro characterization. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 85-94.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3), 131-149.
- Vinholes, J., Silva, B. M., & Silva, L. R. (2015). Hydroxycinnamic acids (HCAS): Structure, biological properties and health effects. *Advances in Medicine and Biology; Nova Biomedical: Waltham, MA, USA*, 88.
- Wang, E. C., & Wang, A. Z. (2014). Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. *Integrative Biology*, 6(1), 9-26.
- Weichselbaum, E., & Buttriss, J. (2010). Polyphenols in the diet. *Nutrition Bulletin*, 35(2), 157-164.
- Wen, Z.-S., Liu, L.-J., Qu, Y.-L., OuYang, X.-K., Yang, L.-Y., & Xu, Z.-R. (2013). Chitosan nanoparticles attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in mouse macrophage RAW264.7 cells. *Marine drugs*, 11(10), 3582-3600.

- Weydert, C. J., & Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols*, 5(1), 51.
- Wilson, J. S., Ganesan, K., & Palanisamy, M. (2011). Effect of sinapic acid on biochemical markers and histopathological studies in normal and streptozotocin-induced diabetes in wistar rats. *Int J Pharm Pharm Sci*, 3(4 Suppl), 115-120.
- Wu, S., Zhu, W., Thompson, P., & Hannun, Y. A. (2018). Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nature communications*, 9(1), 1-12.
- Yadav, H. K., Almokdad, A. A., Sumia, I., & Debe, M. S. (2019). Polymer-based nanomaterials for drug-delivery carriers *Nanocarriers for Drug Delivery* (pp. 531-556): Elsevier.
- Yallapu, M. M., Gupta, B. K., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2010). Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *Journal of colloid and interface science*, 351(1), 19-29.
- Yerlikaya, F., Ozgen, A., Vural, I., Guven, O., Karaagaoglu, E., Khan, M. A., & Capan, Y. (2013). Development and evaluation of paclitaxel nanoparticles using a quality-by-design approach. *Journal of pharmaceutical sciences*, 102(10), 3748-3761.
- Yoon, B. H., Jung, J. W., Lee, J.-J., Cho, Y.-W., Jang, C.-G., Jin, C., . . . Ryu, J. H. (2007). Anxiolytic-like effects of sinapic acid in mice. *Life sciences*, 81(3), 234-240.
- Yun, K.-J., Koh, D.-J., Kim, S.-H., Park, S. J., Ryu, J. H., Kim, D.-G., . . . Lee, K.-T. (2008). 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*, 56(21), 10265-10272.
- Zalewska-Ziob, M., Adamek, B., Kasperczyk, J., Romuk, E., Hudziec, E., Chwalińska, E., . . . Bruliński, K. (2019). Activity of Antioxidant Enzymes in the Tumor and Adjacent Noncancerous Tissues of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
- Ziegler, U., & Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. *Physiology*, 19(3), 124-128.
- Zych, M., Kaczmarczyk-Sedlak, I., Wojnar, W., & Folwarczna, J. (2018). The effects of sinapic acid on the development of metabolic disorders induced by estrogen deficiency in rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgisi: gulsah.akbas34@gmail.com

Konferans Bildirileri

1.

Akbaş, G., Poyraz, F. Ş., Ersöz, M., Duranoğlu, D., Derman, S., & Mansuroğlu, B. (2020). Sinapik asit yüklü nanopartiküllerin meme kanseri hücre dizilerinde incelenmesi. *3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020)*, (s. 147).

2. Poyraz, F. Ş., Akbaş, G., Derman, S., Duranoğlu, D., Arasoğlu, T., & Mansuroğlu, B. (2018). Production and Characterization of Sinapic Acid Loaded PLGA Nanoparticles. *4th International Congress on Applied Biological Sciences*, (s. 220).

Projeler

1. Akbaş, G., Poyraz, F. Ş., Derman, S., Duranoğlu, D., Ersöz, M., & Mansuroğlu, B. In vitro Biyolojik Aktivite Çalışması: Sinapik Asit Yüklü Nanopartiküller. (s. 2). TÜBİTAK Projesi, 117Z016.