



**ATKESTANESİ ÖZÜTÜNÜN KANSER
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ece KAYA

Eskişehir 2020

**ATKESTANESİ ÖZÜTÜNÜN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ**

Ece KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Haziran 2020

ÖZET

ATKESTANESİ ÖZÜTÜNÜN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ

Ece KAYA

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Haziran 2020

Danışman: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU

Kanser, tüm dünyadaki insanlar için büyük sorun ihtiva eden hastalıkların başında gelmekte ve hücre büyüme ve bölünmesini kontrol eden genlerin hasar görmesiyle ortaya çıkan kompleks bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Kanser tıp alanındaki yapılan çalışmalar ve ilerlemelere rağmen önemini halen korumaktadır. Kanser çeşitlerinden biri olan prostat kanseri, prostat dokusunda gelişmeye başlayan kötü huylu (malign) hücrelerin sebep olduğu ölümlerde 2. sırada yerini korumaktadır. Vücudumuz kanser tedavilerinde kullanılan ajanlara karşı direnç gösterme eğilimindedir. Bu direnç sonucunda yeni ilaçlar ve yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Escin (Aescin), *Aesculus hippocastanum*'un (atkestanesi ağacı) ana aktif bir bileşenidir. Yapılan çalışmalarda escinin yapısında %5-6 protein, %30-40 nişasta, %5.5-7.7 yağ, flavonlar, antioksidan maddeler, glikozitler(aesculin, esculin), saponinler(aescin, escin), B1, C ve K vitaminleri bulunduğu gösterilmiştir. Bu çalışmamızda prostat kanseri tedavisi için Du145 prostat kanseri hücreleri üzerinde escin ve yeni sentezlenen escin yüklü katı lipid nanopartiküllerin potansiyel apoptotik, sitotoksik, antiproliferatif etkileri ve sebep olduğu morfolojik değişiklikler konfokal mikroskopi ve akış sitometri yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: Escin, Du145, Katı lipid nanopartikül, Prostat kanseri, Apoptoz

ABSTRACT

ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF HORSE CHESTHOLE EXTRACT ON CANCER CELLS

Ece KAYA

Department of Biology

Programme in Molecular Biology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, June 2020

Supervisor: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU

Cancer is one of the major problems of diseases for people all over the world and is defined as a complex disease that occurs when the genes that control cell growth and division are damaged. Despite studies and advances in cancer medicine, it still maintains its importance. Prostate cancer, which is one of the types of cancer, maintains its 2nd place in deaths caused by malignant (malign) cells that begin to develop in the prostate tissue. Our bodies tend to resist the agents used in cancer treatments. As a result of this resistance, new drugs and new methods are needed.

Escin (Aescin) is a main active ingredient of *Aesculus hippocastanum* (horse chestnut tree). In the studies conducted, it has been shown that the composition of the body contains 5-6% protein, 30-40% starch, 5.5-7.7% fat, flavones, antioxidant substances, glycosides (aesculin, esculin), saponins (aescin, escin), vitamins B1, C and K. In this study, potential apoptotic, cytotoxic, antiproliferative effects and morphological changes caused by escin and newly synthesized escin loaded solid lipid nanoparticles on Du145 prostate cancer cells for the treatment of prostate cancer were investigated using confocal microscopy and flow cytometry methods.

Key words: β -escin, Du145, Solid lipid nanoparticles, Prostate cancer, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında değerli katkı ve eleştiriyle yol gösteren, bana her zaman sabır gösterip çalışmaya teşvik eden ve üzerimde büyük emekleri olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU'ya, laboratuvar çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan Dr. Canan VEJSELOVA SEZER'e, birlikte laboratuvarda çalıştığımız ve birbirimize her zaman destek olduğumuz arkadaşlarım Büşra ASLAN ve Melike ÇEVİK'e, yüksek lisans tezimin başından sonuna kadar her zaman yanımda olan benden desteklerini hiç esirgemeyen babam Murat KAYA, annem Zehranur KAYA, kardeşim Tuğba KAYA'ya (darısı başına) ve çalışmalarım sırasında bana çok sabır gösterip her zaman varlığıyla destekleyen Ahmet Deniz CANORU'a içtenlikle teşekkür ederim.

Ece KAYA

.../.../20...

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Ece KAYA

.....

(İmza)

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GÖRSELLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.1.1. Kanser oluşum mekanizmaları	2
1.1.2. Prostat kanseri çeşitleri	5
1.1.2.1. <i>Benign prostat hastalığı</i>	5
1.1.2.2. <i>Malign prostat hastalığı</i>	5
1.2. Prostat Kanseri.....	5
1.2.1. Prostat kanseri tanısı	7
1.2.2. Kalıtsal prostat kanseri genleri.....	8
1.3. Escin	9
1.3.1. Escinin fiziksel ve kimyasal özellikleri	9
1.3.2. Escinin kullanım alanları	10
1.3.3. Escin ve kanser ilişkisi	11
1.4. Apoptoz	12
1.4.1. Apoptoz mekanizmaları	13
1.4.2. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler	14
1.4.2.1. <i>Morfolojik görüntüleme yöntemleri</i>	14
<i>Işık mikroskobu kullanımı</i>	14
<i>Floresan mikroskobu / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı</i> 15	
<i>Elektron mikroskobu kullanımı</i>	15

<i>Faz kontrast mikroskobu kullanımı</i>	15
1.4.2.2. İmmunohistokimyasal yöntemler	16
<i>Anneksin V yöntemi</i>	16
<i>TUNEL yöntemi</i>	16
<i>M30 yöntemi</i>	16
<i>Kaspaz-3 yöntemi</i>	16
1.4.2.3. Biyokimyasal yöntemler	17
<i>Agaroz jel elektroforezi</i>	17
<i>Western Blotting</i>	17
<i>Flow Sitometri</i>	17
1.4.2.4. İmmünolojik yöntemler	17
<i>ELISA</i>	17
<i>Fluorimetrik Yöntem</i>	18
1.4.3. Apoptoz ve nekroz farkları	18
1.5. Sitotoksosite	19
1.5.1. MTT Kolorimetrik sitotoksosite testi	21
1.6. Nanobilim ve Teknoloji	21
1.7. Nanopartiküller	23
1.7.1. Katı lipid nanopartiküller (KLN)	24
1.7.1.1. Katı lipid nanopartiküllerin yapısı	25
1.7.1.2. Katı lipid nanopartiküllerin kullanım alanları	27
1.7.1.3. Katı lipid nanopartiküllerin avantaj ve dezavantajları	29
1.7.1.4. Katı lipid nanopartiküllerin sentez yöntemleri	30
<i>Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemleri</i>	30
<i>Mikroemülsiyon yöntemi</i>	32
<i>Çözücü emülsifikasyon-eyaporasyon veya çözücü difüzyon yöntemi</i>	32
<i>Yüksek hızda homojenizasyon/Ultrasonikasyon yöntemi</i>	32
<i>Süperkritik sıvı kullanma yöntemi</i>	33
2. MATERYAL VE METOD	33
2.1. Materyal	33
2.1.1. Kullanılan cihazlar	33
2.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	33

2.2. Metod	34
2.2.1. Kullanılan besi yerinin hazırlanması	34
2.2.2. Du-145 hücrelerinin çoğaltılması.....	34
2.2.3. Escin yüklü katı lipid nanopartiküllerin hazırlanması	36
2.2.4. MTT kolorimetrik sitotoksosite tayini.....	36
2.2.5. Konfokal mikroskopi yöntemi	37
2.2.6. Akış sitometri yöntemi.....	38
2.2.7. İstatiksel analiz.....	38
3. BULGULAR.....	39
3.1. MTT Kolorimetrik Sitotoksosite Bulguları.....	39
3.1.1. Escinin Du-145 hücreleri üzerindeki sitotoksosite bulguları.....	39
3.1.2. Escin yüklü katı lipid nanopartiküllerin Du-145 hücreleri üzerindeki sitotoksosite bulguları	40
3.2. Konfokal Mikroskopi Bulguları	41
3.2.1. Escinin Du-145 hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskobik bulguları	42
3.2.2. Escin yüklü katı lipid nanopartiküllerinin Du-145 hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskobik bulguları...	44
3.3. Akış Sitometri Bulguları	47
3.3.1. Anneksin V-FITC uygulamasının akış sitometrisi bulguları.....	47
3.3.1.1. <i>Escin uygulanan Du-145 hücrelerinin anneksin-V bulguları ..</i>	48
3.3.1.2. <i>Escin yüklü katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı Du-145 hücrelerinin anneksin-V bulguları</i>	49
4. TARTIŞMA SONUÇ	50
KAYNAKÇA	53
ÖZGEÇMİŞ	

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. Prostat kanseri risk faktörleri	6
Tablo 1.2. β -escinin in vitro ve in vivo çalışmalardaki anti kanser etkileri.....	12
Tablo 1.3. Apoptoz ve nekrozun kıyaslaması	19
Tablo 1.4. Katı lipid nanopartiküllerin ilaç uyum modellerini karşılaştırma.....	27



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Karsinogenezin oluşumu	3
Şekil 1.2. Prostat kanseri yatkınlık genleri	9
Şekil 1.3. Escinin iki boyutlu kimyasal yapısı	10
Şekil 1.4. Apoptotik yollar.....	14
Şekil 1.5. Apoptozun morfolojik görünümü.....	18
Şekil 1.6. MTT bileşiğinin kimyasal yapısı.....	21
Şekil 1.7. Nanopartikül sistemleri	24
Şekil 1.8. Katı lipid partiküllerin gelişimi	24
Şekil 1.9. Katı lipid nanopartiküllerin temel yapısı	25
Şekil 1.10. Katı lipid nanopartiküllerin ilaç katılma modelleri	25
Şekil 1.11. KLN'lerin üretimi için sıcak ve soğuk homojenizasyon yöntemi.....	31
Şekil 3.1. Escinin Du145 hücrelerine 24 saatlik uygulanması sonucunda elde edilen grafik	39
Şekil 3.2. Escin yüklü KLN formülasyonunun Du145 hücreleri üzerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen grafik	40
Şekil 3.3. Du145 kontrol hücrelerinin apoptotik profili	47
Şekil 3.4. Escin uygulanan Du145 hücrelerinde Anneksin-V uygulaması sonucu apoptotik profili.....	48
Şekil 3.5. Escin yüklü katı lipid nanopartikül formülasyonunun Du145 hücrelerinde Anneksin-V uygulaması sonucu apoptotik profili	49

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 3.1. Akridin Oranj ve falloidin ile ikili boyanmış Du145 kontrol hücrelerinin konfokal görüntüsü(1)	41
Görsel 3.2. Akridin Oranj ve falloidin ile ikili boyanmış Du145 kontrol hücrelerinin konfokal görüntüsü(2)	42
Görsel 3.3. Escin'in Du145 hücrelerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü(1)	43
Görsel 3.4. Escin'in Du145 hücrelerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü(2)	43
Görsel 3.5. Escin'in Du145 hücrelerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü(3)	44
Görsel 3.6. Escin yüklü katı lipid nanopartiküllerin Du145 hücreleri üzerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü(1)	45
Görsel 3.7. Escin yüklü katı lipid nanopartiküllerin Du145 hücreleri üzerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü(2)	46
Görsel 3.8. Escin yüklü katı lipid nanopartiküllerin Du145 hücreleri üzerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü(3)	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
BPH	: Benign prostat hiperlazisi
PCa	: Prostat Kanseri
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
nm	: Nanometre
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide sitotoksosite testi
°C	: Santigrad derece
KLN	: Katı lipid nanopartikül
ml	: Mililitre
CO₂	: Karbondioksit
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute Medium
FBS	: Fetal Bovine Serum
PBS	: Phosphate Buffered Saline
DMSO	: Dimetil sülfoksit
µM	: Mikromolar
IC₅₀	: İnhibitör Konsantrasyonu 50
µl	: Mikrolitre
rpm	: Revolutions per minute

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Vücudumuzu oluşturan hücreler bir araya gelerek dokuları oluştururken, dokularda bir araya gelerek organları teşkil etmektedir. Hücreler, organ ve dokular oluşurken belirli iş bölümleri yaparak bir araya gelirler. Organizmanın ana birimi olan bu hücreler, belli bir hızda ve kontrol altında ürerler. Öbür taraftan zamanı dolan hücrelerde belirli bir hızda ölmektedir.[1]

Hücrelerin, bağımsız bir şekilde çoğalmalarına kanser denilmektedir. Çoğalma olayı sırasında kanser hücresinde, normal hücrelere nazaran yapısal ve işlevleri açısından farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Kanser hastalığı, hücrelerin köklü metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdiği çok basamaklı bir süreçten meydana gelmektedir.[1,2]

Günümüzde ortaya çıkan sağlık problemlerin başında kanser gelmektedir. Tıbbi alanda ortaya çıkan büyük ilerlemelere karşın kanser, önemini korumaktadır. Kansere karşı verilen bu zorlu mücadelede erken tanı büyük önem taşımaktadır.[3] Kanser tedavisinin yanında kansere neden olan etmenlerin bulunması, kanserin oluşmadan engellenmesinde çok büyük rol oynamaktadır.[4]Kanser her zaman belirti göstermemektedir. Kanserden kaynaklanan semptomlar, vücudun hangi bölümünün etkilendiğine göre değişiklik göstermektedir.[5] Bazı literatürlere göre kanserde oluşabilecek belirtiler şunlardır;

- Yorgunluk
- Cildin altında hissedilen şişlik
- İstmeden hızlı kilo alma veya kaybetme
- Cildin sararması, koyulaşması ya da kızarması
- İyileşmeyen yaralar ya da var olan benlerdeki değişiklikler gibi cilt değişiklikleri
- Bağırsak veya mesane alışkanlıklarındaki değişiklikler
- Ateş, ağrı ve gece terlemeleri
- Kalıcı öksürük veya nefes darlığı
- Yutma güçlüğü
- Ses kısıklığı
- Yedikten sonra kalıcı hazımsızlık veya rahatsızlık [5,6]

1.1.1. Kanser oluşum mekanizmaları

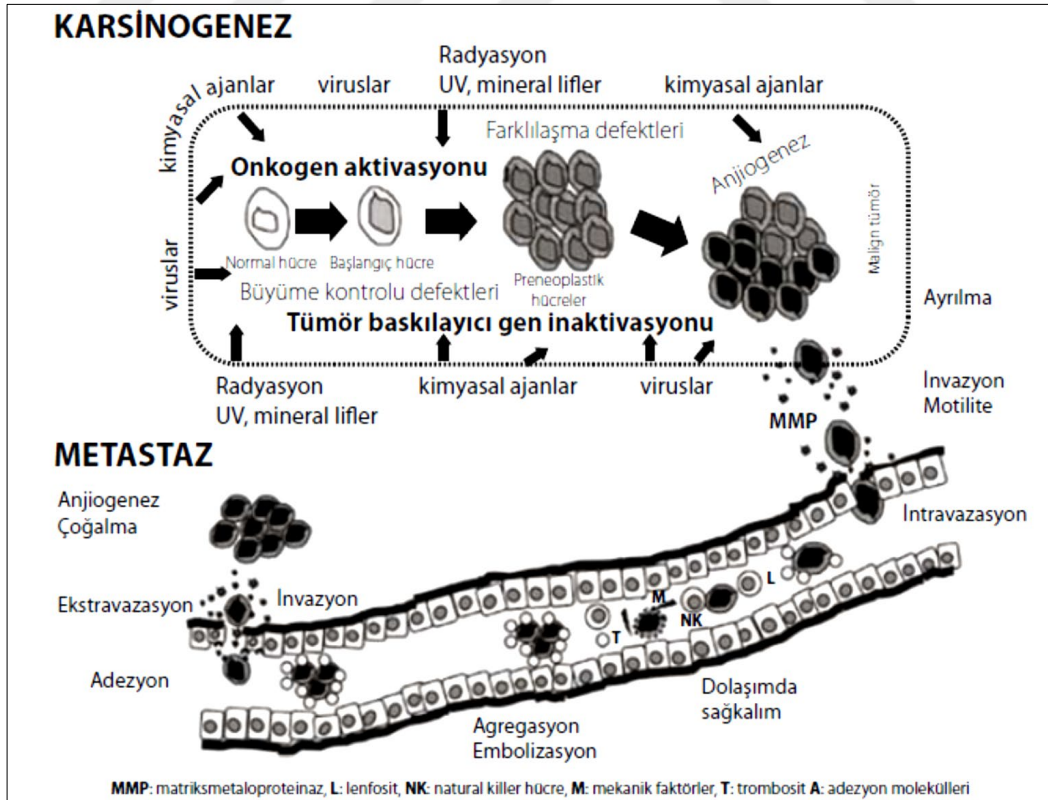
Kanser, hücrenin büyüme ve bölünme özelliğinin bozulmasıyla ortaya çıkar ve somatik (fiziksel) genetik rahatsızlıkların en sık görüleni ve en komplike olanıdır. Bakterilerden virüslere, radyasyondan kalıtıma, çevresel faktörlerden beslenme alışkanlığına ve kimyasallara kadar birçok faktör kanser oluşumuna yol açmaktadır. Kanser oluşması için birçok faktör gerekli olsa da tek bir genetik değişiklik bile kansere sebep olabilir. Kansere sebep olan bu etmenlerin hepsi DNA'nın yapısını bozmakta ve düzelterek mekanizmasının çalışmasına engel olmaktadır. Böylece DNA kendini tamir edemediği için metastazlara sebep olur.[7]

Kanser oluşumunda serbest radikallerin önemli bir etkisi vardır. Serbest radikaller ortaklanmış elektron içerdiklerinden oldukça fazla reaktiftirler. En önemli serbest radikaller oksijenden oluşan reaktif oksijen türleridir (ROS). ROS, kanserin oluşumuna etki ederek, oluşumunda birçok rol üstlenir. ROS'un oluşturduğu tahribat ve kendi oluşumunu engellemek için vücuttaki savunma mekanizmalarına, antioksidan sistem denmektedir. Antioksidan sistem, hücrel oksidan sisteme karşı dengeyi sağlamakla görevlidir. Hücrel oksidan sistem aşırı yüklenirse denge bozulur ve ROS hücre hasarı oluşturur. Karsinojenler, ROS ve ROS oluşumuna yol açmakta olup aynı zamanda; büyüme desteği, büyüme inhibisyonu ve apoptotik sinyal yollarına tesir ederek tümör oluşumunu ve aktivasyonunu etkileyebilmektedir. DNA tahribatı oksidatif stresle gelişir ve onarılmazsa premutajenik özellik gösterir ve bununla birlikte mitozun hasarlı kopyalanmış DNA ile devam etmesi tümör hücresi ile sonlanabilir. Bunlara ek olarak reaktif oksijen türleri, Protein ve lipid peroksidasyonu ve plazma membranında hücrel aktiviteleri etkilemektedir. Bunun sonucunda ise yapısal değişiklikler oluşturmaktadır. ROS; büyüme faktörleri ve reseptörleri, protein kinazları, sinyal iletimi, onkogenlerin aktivasyonu ve baskılayıcı genlerin inaktivasyonu üzerine etki yapma yeteneğine sahiptir. Bu yetenekleri ile ROS, onkogenler ve kanser oluşumunda önemli etkiye sahiptir. [7,8]

Dokularda sürekli yenilenen kök hücreler karsinogenesis için hedef hücreler konumundadır. Tümör oluşumu 2'ye ayrılmaktadır. Bunlardan birincisi, neoplastik transformasyon (genetik defektlerin gelişimiyle normal hücrenin neoplastik hücreye dönüşümü) ve ikincisi neoplastik gelişimdir. Neoplastik transformasyon, onkogenesis ve karsinogenesis olayların ilk basamağını oluşturmaktadır. DNA replikasyonunun ve tamir mekanizmalarının düzenli çalışmamasının neticesinde hücrelerde başlayan

mutasyonların sonucu neoplastik transformasyondur. Mutasyonlar, büyüme kontrolü kaybı ile sonuçlanmakta olup proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve büyümeyi kontrol eden genlerde oluşur. Tümör oluşumunun ikincisi olan neoplastik gelişme ise, kanser hücresinin klonal(genetik bakımdan aynı hücre) proliferasyonuna sebep olup uzak dokulara yayılmasını(metastaz) sağlar. Devamlı proliferasyonla tümörün malignansiye doğru giden progressif değişiklikler gerçekleşir. Büyüme faktörlerini ve reseptörlerini kodlayan genlerde meydana gelen mutasyon, büyüme faktörlerini onkogenik hale getirir. Mutasyondan daha sık görülen olay, büyüme reseptörlerinin aşırı yapımıdır. Büyüme faktörlerinin ileti yollarındaki proteinlere bağlanan bazı onkoproteinler, büyüme faktörlerinin etkilerini engellemektedir. Onkogen türlerinden olan Ras(protein) hem büyüme faktör genlerinin ölçsüz üretimine yol açmaktadır hem de hücreyi transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α) gibi büyüme faktörlerinin aşırı salınımına yönlendirir. Değişen bu büyüme sinyalinin neticesinde kanser ile son bulmaktadır. Kanser oluşumunda temel neden olan büyüme kontrolünün denetiminden yoksun olması, kanser hücrelerinin yapısını çok iyi göstermektedir. [7,9]

Şekil 1.1. Karsinogenezin oluşumu[10]



Protoonkogenler; büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz için alınan iletiler ile ilgili işlev gören birçok proteinin sentezinden sorumludurlar. Protoonkogenler ve onkogenler normal hücre büyümesinin düzenlenmesinde görev alan proteinleri sentezlerler. Hücre ileti yollarındaki proteinleri kodlayan protoonkogenlerin (sis, hst-1, int-2, erb-B1, erb-B2, fms, ret, ras, abl, myc, N-myc, cyclin D, CDK4 vb.) mutasyona uğraması birçok sonuca yol açmaktadır. Bunlar, büyüme faktörlerinin çok fazla üretimi, hücre membranı ve çekirdek arasındaki ara yolların kontrolsüz uyarılması ve hücre bölünmesine engel olunamaması sonuçlarıdır. Protoonkogenlerin onkogenler haline dönüşümü, hücre büyümesinin kontrol mekanizmasını bozmakta ve kanser hücrelerinin çoğalıp büyümesine yol açmaktadır. Onkogenler ise hücre transformasyonunu başlatma ve devam ettirme yetisine sahiptir. Hücrenin normal çalışma düzenini bozarak hücreyi apoptoza yönlendirir. 30'dan fazla onkogen olduğu bilinmektedir(v-Sis, v-ErbB, v-kit, Mutant G_s, ras, raf, jun, fos, bcl-2 ailesi, p53, rb geni vb). Normal şartlarda transformasyon oluşturmeyen protoonkogenler; delesyonlar, eklentiler, gen amplifikasyonları, nokta mutasyonları, DNA düzenlenmeleri ve translokasyonlar benzeri genlerde meydana gelen değişikliklere aktive olarak onkogen haline dönüşmektedir. İnsan tümörlerinde sıklıkla karşımıza çıkan onkogen anomalisi ras geni mutasyonu olarak bilinmektedir. Ras proteinleri pasif durumdayken GDP (Guanozin difosfat) bağlar ve hücreler büyüme faktörleri ile uyarıldığında GDP → GTP haline çevirir. Aktif olan ras proliferasyon düzenleyicilerini etkiler ve çekirdek hücre proliferasyonu için aşırı uyarı alır. Normal ras proteininde bu dönem kısa sürmektedir ve instrinsik GTPaz aktivitesi ile GTP hidroliz olarak protein etkisiz şekline çevrilmektedir. Aktif ras'ın GTPaz aktivitesi, GTPaz aktive eden proteinlerle belirgin olarak artmaktadır.[7]

Büyümeye destek olan protoonkogenler ve büyümeyi durduran ve büyümenin gerektiği zamanda sınırlandırılmasından sorumlu olan tümör baskılayıcı genler(pRb, p53, p21 proteinlerini sentezleyen genler, siklin ilişkili kinaz (CDK) inhibitörleri) ve apoptozu denetleyen genler olarak üç sınıf normal regülatör gen hasarlanmanın hedefleri arasındadır. Buna ek olarak, DNA onarımından sorumlu genler de kanser oluşumunda hedef genler arasındadır.[7,9]

1.1.2. Prostat kanseri çeşitleri

1.1.2.1. Benign prostat hastalığı

Benign prostat hastalığı diğer bir adıyla benign prostat hiperlazisi (BPH), prostatın kötü huylu olmayan büyümesine verilen isimdir. BPH, hastanın psikolojik durumunu, uyku kalitesini, günlük yaşamını ve seksüel durumunu etkilese dahi ölümcül bir hastalık değildir. Benign prostat büyümesi, prostattaki hücrelerin büyümesi ile (hipertrofisi) oluşmaz. Büyüme, prostattaki hücre sayısının anormal artışı(hiperlazi) nedeni ile olmaktadır. Benign prostat hiperlazisi erkeklerde alt üriner sistem semptomlarına (AÜSS) neden olur. AÜSS, ani sıkışma hissi, sık idrara çıkma gibi semptomları içeren bir terimdir. Benign prostat hiperlazisi çoğunlukla 40 yaş ve üzeri erkeklerde rastlanmaktadır. Erkek hastalarda yaş arttıkça oranlar artmaktadır. (50 yaş üzerindeki erkeklerin %50'si, 60-70 yaş arasındakilerin %65'inde ve 80 yaşın üzerindekiilerin %90'ında). Yaşlandıkça bu hastalığın artması, yaşlanma sürecindeki hormonal değişikliklere prostatın verdiği cevap ile oluşmaktadır. Prostat iltihabı anlamına gelen prostatit 50 yaş altı erkeklerde daha sık görülmesine rağmen 50 yaş üzeri erkeklerde ise BPH ve prostat kanseri daha sık görülür.[12,13-15]

1.1.2.2. Malign prostat hastalığı

Malign (kötü huylu, habis) prostat hastalığı, prostat dokusunda gelişmeye başlayan kötü huylu hücrelerin neden olduğu bir hastalıktır. Bu hastalığa "Prostat Kanseri" denir. Malign, erkek bireylerde en sık görülen hastalıktır. Kanser sebebi ile kaynaklanan ölümlerde 2. sırada yerini almaktadır.[11,14,16]

1.2. Prostat Kanseri

Prostat, meni içeriğinin bir bölümünü oluşturan koyu kıvamlı sıvının üretildiği bir bez dokusu olarak bilinmektedir. Karın bölgesinde yer alan organların idrar torbasından sonraki en alt bölümünde, kalın bağırsağın son bölümünün önünde yer almaktadır.[11] Prostat, erkek üreme sisteminde bir salgı bezi olarak bilinmektedir. Temel görevi meninin sıvı kısmını oluşturmaktadır. Yetişkin bir erkek bireyde kestane büyüklüğünde ve yaklaşık olarak 18-20 gram ağırlığa denk gelmektedir.[12]

Erkek genital sisteminin bir bezi olan prostat, erkek uretrasının başlangıç kısmını oluşturur. Bu kısımda meydana gelen bazı tümörler, prostat bezinin işlevini tam yerine

getirememesine sebep olarak kanser oluşumuna yol açmaktadır.[14] Prostat kanseri (diğer isimleri PCa, PK) erkekler için oldukça tehlikeli bir kanser olmakla birlikte kansere bağlı ölümlerin önde gelenlerindedir. Solid bir kanser türü olan prostat kanseri, Avrupa’da ve Amerika’da 1000 erkekten 214’ünde görülmektedir. Erken teşhis mümkün olduğunda sağ kalım oranları ciddi bir şekilde artarak, hastalarının 5 yıllık sağ kalma oranı %99’a ulaşmaktadır.[17] Prostat kanserinde hastanın psikolojinde değişiklikler meydana gelmektedir. Bunlar başlıca anksiyete ve depresyondur. Hastalığa bağlı diğer değişiklikler ise üriner tıkanıklık ve metastatik ağrılardır. Erkeklerde prostat kanserinden sonra sırasıyla akciğer ve kolorektal kanser gelmektedir.[18]

Prostat kanseri risk faktörleri tam olarak belirlenmemesine rağmen 4 grup altında incelenebilmektedir. Bunlar; biyolojik, genetik temel, epigenetik ve genomik instabilitedir. Kanser genetik temelli olduğu için eğer birinci derece akraba olarak bir kişi etkilenirse risk iki katı veya fazlasına çıkmaktadır. Prostat kanserli hastaların yaklaşık %9luk bir kısmı gerçek kalıtsal prostat kanseridir. Prostat kanseri risk faktörlerinin yanı sıra olası risk faktörleri ise diyetle alınan yağ ve hormonlardır. Potansiyel risk faktörleri ise vasktom, kadmiyum, A ve D vitamini olabilmektedir.[19]

Tablo 1.1. Prostat kanseri risk faktörleri[20]

Prostat Kanseri Risk Faktörleri			
Biyolojik	Genetik Temel	Epigenetik	Genomik İstabilite
<ul style="list-style-type: none"> •Yaş •İrk •Aile öyküsü •Androjen reseptörü •Steroid hormonları •Büyüme faktörleri •Beslenme •Nöropeptidler •Çevre 		<ul style="list-style-type: none"> •Hipermetilasyon •Hipometilasyon •Genomik İmprinting •Histon modifikasyonları •RNA interferazlar (siRNA, miRNA) 	<ul style="list-style-type: none"> •Kromozomal aberasyonlar •Heterozigosite kaybı •Tek nükleotid polimorfizmleri •Gen füzyonları •Mutasyonlar •Onkogenik aktivasyon •Tümör supresör genlerinin baskılanması •Gen regülatörler •RNA interferazlar

1.2.1. Prostat kanseri tanısı

Prostat kanserinin erken safhalarında genellikle hastada herhangi bir yakınma meydana gelmez. Hastalarda gözlemlenebilen yakınmalar:

- Geceleri sıklıkla idrara çıkma gereksinimi,
- İdrarın gecikmesi ve idrar yapmanın bitiminde idrarın az miktarda akmaya devam etmesi,
- İdrara çıkamama,
- İnce veya kesik kesik idrar yapma,
- İdrar yaparken yanma veya ağrı,
- İlişki sırasında ağrılı ejakülasyon (boşalma),
- İdrar veya spermde kan görülmesi.

Erken safhalardan sonraki safhalarda olan hastalar bu belirtilerin yanı sıra sırt kalça ve/ veya bacak ağrıları çekmektedir. Bu belirtilerin hepsi veya bir tanesi kanser ile alakalı olabilir ve buna bağlı olarak gelişebilir. Fakat bu belirtilerin bir tanesinin görülmesi kesinlikle kanser anlamına gelmemektedir. Bir başka sağlık problemi olabilir bu yüzden hasta bir üroloji uzmanına muayene olmalıdır.[11] Prostat kanseri teşhisi konulmuş bir hastada uygulanacak tedavi için öncelikle bu hastalığın vücutta ne kadar yayıldığı ve yaygınlığını(evre) bilmek gerekmektedir. Kanserin yalnızca prostat bezi içerisinde sınırlı olup olmadığı ve ya prostat dışı yayılım olup olmadığı evreleme sırasında araştırılır. Bu evrelemeleri gözlemek için genellikle her hastada akciğer grafisi, bilgisayarlı tomografi, kemik sintigrafisi, manyetik rezonans görüntüleme gibi yöntemlerden faydalanılır.[11] Evrelemeye klinik olarak bakacak olursak burada kullanılan parametreler; PSA, parmakla rektal muayene, prostat biyopsi bulguları ve görüntüleme yöntemlerini sayabiliriz. Klinik evreleme, hastalığın yayılımını ve prognozunu tahmin etmek amacıyla yapılır ve en uygun tedavi seçilir.[21]

Prostat kanseri evrelemesinde en sık kullanılan evreleme yöntemi 2009 TNM (tümör, lenf nodu, metastaz) yöntemidir.[21] Bu yöntemde önemli olan 5 faktör şunlardır:

T: Kanserin prostat içindeki durumu hakkında bilgi verir. Prostat kanseri ne tarafa tutulmuş bir tarafta mı yoksa iki tarafta mı veya prostat kanseri idrar torbası, kalın bağırsak ya da kaslara geçmiş mi gibi sorulara yanıt vermektedir.

N: Prostat kanserinin lenf bezlerine ulaşmış olup olmadığı hakkında bilgi verir.

M: Kanserin, prostattan uzakta bulunan vücut içi organlara geçip geçmediği hakkında bilgi verir.

PSA: Prostat Spesifik Antijen (PSA) düzeyi 10'un altında mı, 10-20 arası mı veya 20'den fazla mı sorularına cevap verir.

Gleason Skor: Kanserin agresifliği hakkında bilgiler ediniriz. Gleason 6 olması kanserin agresifliğinin az olması demektir. 8,9,10 olması yüksek agresiflik gösterir.

Prostat kanserini 5 evrede toplayabiliriz. Bunlar;

Evre 1: Hastanın Gleason skoru 6'da ve PSA değeri 10'dan küçük olmalıdır. Kanseri, prostatın tek tarafında ve %50'den azını kapsamalıdır.

Evre 2A: Gleason skoru 7 olan ve PSA değeri 20'den fazla olan hastalar için olan evredir. Kanseri, prostatın bir tarafındadır ve kapsül dışına çıkmamıştır.

Evre 2B: Gleason skoru 8 veya daha fazladır. Kanseri, prostatın iki tarafında da vardır.

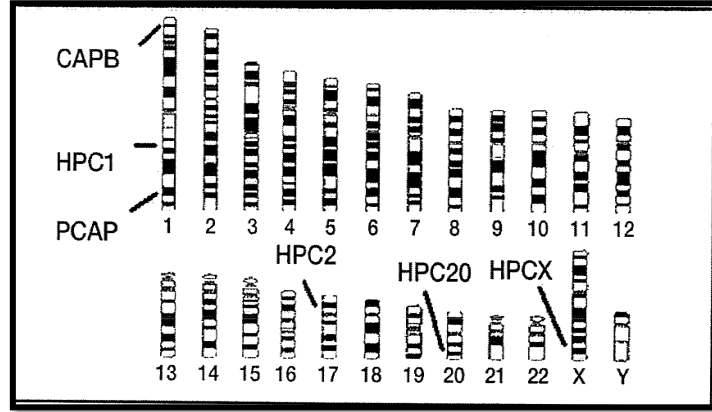
Evre 3: Kanseri, prostat kapsülünün dışına çıkan hastalardır. Prostat kanseri, V. Seminalis salgı bezine geçmektedir.

Evre 4: Prostat kanseri, idrar torbasına, kalın bağırsağa ve karın ön duvarına geçmiştir. Lenf bezlerine ve diğer organlara sıçramıştır. Son evrede ise tedavi oldukça zordur, kanserin gelişimi oldukça hızlı ilerlemektedir.[22]

1.2.2. Kalıtsal prostat kanseri genleri

Bilinen prostat genlerinin sayısı her geçen gün artmaktadır. Prostat kanseri genleri artmasına rağmen, genlerin %5-10'u majör genlerden meydana gelmektedir. Bundan dolayı kalıtsal prostat kanseri genlerinden çok diğer genlerin polimorfizmleri oldukça önemlidir. İlk prostat kanseri lokusu, HPCI(hereditary prostate cancer1), 1q24-25'te daha sonra sırasıyla; PCAP(predisposing for prostate cancer), 1q42.2-43, HPCX, Xq27-28, CAPB(predisposing for prostate and brain), 1p36, HPC20, 20q13 ve HPC2/ELAC2 17p lokuslarıdır.[23]

Şekil 1.2. Prostat kanseri yatkınlık genleri[23]



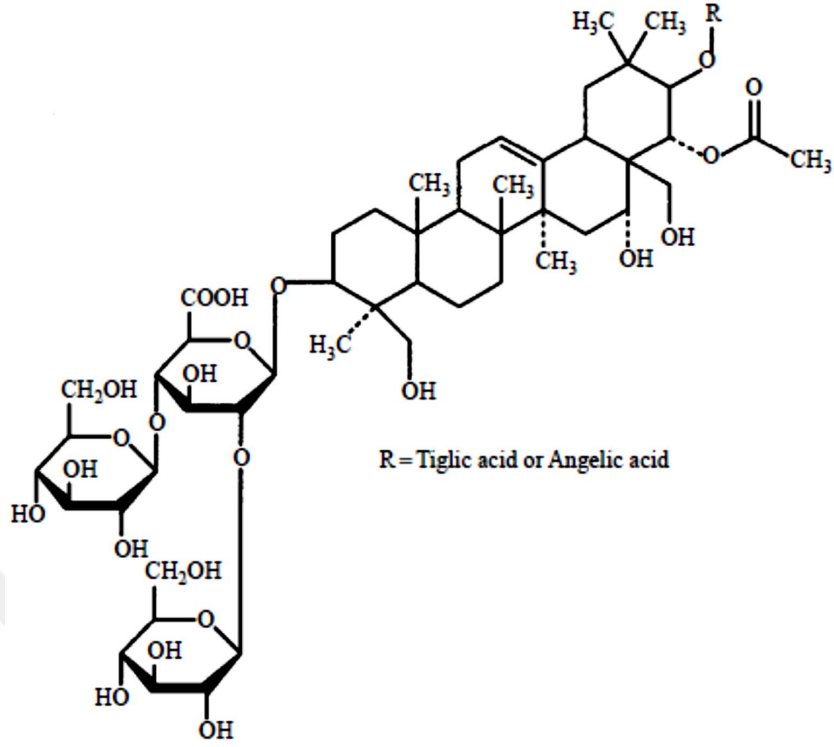
1.3. Escin

Escin veya aescin, *Aesculus hippocastanum*'un (at kestanesi ağacı) ana aktif bileşenidir. Escin, at kestanesi tohumundan üretilen aktif bir farmasötik maddedir. β -escin ve α -escin olmak üzere iki formda bulunan ve triterpenoid saponinlerin bir karışımı olarak ortaya çıkmaktadır. β -escin ana aktif bileşendir ve yüksek sıcaklıklarda α -escin'e dönüştürülebilir. Protoescigenin, barringtogenol, kriptoescin ve benzopirronlar da dahil olmak üzere çeşitli bileşenleride içermektedir.[24-26]

1.3.1. Escinin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Escinin, Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) ismi: (2 S, 3 S, 4 S, 5R, 6R) -6 - [[(3 S, 4 S, 6 a R, 6 b S, 8 R, 8 a R, 9 R, 10 S, 14 b R) -9-asetiloksi-8-hidroksi-4,8 a -bis (hidroksimetil) -4,6 bir, 6 b, 11,11,14 B -heksametil-10 - [(Z) -2-methylbut- 2-enoil] oksi-1,2,3,4 a , 5,6,7,8,9,10,12,12 a , 14,14 a-tetradecahydropicen-3-il] oksi] -4-hidroksi-3,5-bis [[(2 S, 3 R, 4 S, 5 S, 6 R) -3,4,5-trihidroksi-6- (hidroksimetil) oksan-2-il] oksi] oksan-2-karboksilik asittir. Anavatanı Balkanlar olan escin, 20-30 cm arası boyu olan sık dallı yuvarlak tepeli bir ağaçtır. Işınal tüysü yapraklı ve parlak kahverengi tohumları vardır. Süs bitkisi olarak yol kenarlarında kullanılır. Escinin bileşiminde: protein(%5-6), nişasta(%30-40), yağ(%5.5-7.7), flavonlar, antioksidan maddeler, glikozitler(aesculin, esculin), saponinler(aescin, escin), B1, C ve K vitaminleri bulunmaktadır. Kimyasal formülü $C_{55}H_{86}O_{24}$ olan escinin molekül ağırlığı 1131.269 g.mol⁻¹, erime sıcaklığı 224-226°C ve pH'ı 3 ile 4 arasındadır. Escin %95 toz-pudra formunda olup oda sıcaklığında (25°C) saklanabilir.[24,27,29]

Şekil 1.3. Escinin iki boyutlu kimyasal yapısı[28]



1.3.2. Escinin kullanım alanları

At kestanesi ağacı olan *Aesculus hippocastanum* L. (Hippocastaneceae) Türkiye’de çok yaygın bir ağaçtır. Türk halk tıbbında kullanımı, at kestanesinin tohumlarını ezip demleme çay hazırlayarak içmek, böbrek taşını düşürmekte ve mide ağrısına iyi gelmektedir. Bir diğer kullanımı hemoroit semptomlarını hafifletmek için tohumlarının yutulmasıdır. Ayrıca ameliyat sonrası ödem atması içinde kullanılmaktadır. At kestanesi tohumları Avrupa’da kronik venöz yetmeçlik gibi venöz bozuklukları, sırt ağrısı, suşlar, spor yaralanmaları gibi enflamatuar rahatsızlıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır. *Aesculus hippocastanum* tohumları fitoterapi ve geleneksel ilaçlarda yaygın olarak kullanılır. Bitkinin tohum ekstresi doza bağımlı olarak hem enzimatik hemde enzimatik olmayan *in vitro* lipit peroksidasyonunu inhibe etmektedir.[25,30]

1.3.3. Escin ve kanser ilişkisi

Escinin kanser ile ilişkisini anlamak ve belirlemek için kanser tedavisi adına pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. β -escinle yapılan bir çalışmada, terapötik yararından bahsetmiş, β -escinin iyonların kanallarına daha iyi girebildiğini ve böylece venöz gerginliğini azalttığını ve prostagladin-F2a'nın damarlardan salınmasını sağlamaktadır. Bu özellikler, β -escini potansiyel bir kanser kemopreventif ajan yapmaktadır. Aynı şekilde sıçanlar üzerinde bir deney yapılmış ve protagladin-F2a, dimetilhidrazin kaynaklı sıçan kolon adenokarsinomunda hücre proliferasyonunu güçlü bir şekilde inhibe etmiştir. Bir başka çalışmada at kestanesinden izole edilen escinin karagenan kaynaklı arka pençe ödemi üzerindeki inhibitör etkisini belirtmiştir. Buna ek olarak escinin bir sıçan modelinde antiülserojenik etkisi gösterilmiştir.[31,32] β -escin ile yapılan çeşitli tümör dizileri [insan oral mukozal hücre dizisi (KB hücreleri), fare karaciğer kanseri (H22) ve sarkom (S180) hücre dizileri] çalışmalarında tümör dizilerinin büyümesini inhibe edebileceği belirtilmiştir. β -escinin insan kolon kanseri hücre çizgileri HT-29 ve HCT-116'da p21 indüksiyonu yoluyla antikanser aktivitesini gözlemlemişlerdir. β -escinin fosfo-Rb ve siklin A seviyelerini düşürerek, G1-S fazında insan kolon kanseri hücrelerinin büyümesinin durdurulmasına ve proliferasyonun inhibisyonuna yol açtığını belirtmişlerdir.[33]

Escinin insan pankreas kanseri üzerine yapılan çalışmada ise kanserli hücre hatlarında %80'lik bir azalma olduğunu ve böylece escinin pankreas kanseri hücrelerinin büyümesinin güçlü bir inhibitörü olduğunu bulmuşlardır[34]. Başka bir çalışmada ise osteosarkom üzerindedir ve bu çalışmada osteosarkom hücrelerinde apoptozun indüklendiği ve escinin bu hücreler üzerinde antiproliferasyon etkisine sahip olduğunu tespit etmişlerdir.[35]

Tablo 1.2. *β-escinin in vitro ve in vivo çalışmalarındaki anti-kanser etkileri*[33]

S.No.	Type of cancer	Organ site/cell lines or animal model	Molecular markers ↓inhibition ↑induction
In vitro studies			
1)	Human oral, mice liver cancer and sarcoma cell line	KB cells(human Oral) H22 and S180 (Mice)	Growth
2)	Human colon cancer	HT-29, HCT-116	↑pRB, cyclins A and E ↑p21, apoptosis
3)	Hepatocarcinoma	HepG2	↓G1/S phase ↑apoptosis
4)	Human tumor cells	KBM-5 , A293, H1299 Jurkat, U266	↓COX-2, IAP-2, ICAM-1, MMP-9 VEGF, Bcl-2, Cyclin-D1, NF-KB, IKK-γ
5)	Human prostate cancer cells	CRPC, PC-3 and DU-145	↓Bcl-2, Bcl-xL, XIAP, cIAP1 ↑Apoptosis, G2/M arrest
6)	Human hepatocarcinoma	HepG2, PLC/PRF5	↓STAT-3, c-SRC, JAK2, Cyclin D1, Bcl-2, Bcl-xL, Survivin and VEGF
7)	Human hepatocarcinoma	SMMC-7721	↑Caspase-3,9 and 8 activity Bcl-2
8)	Human cholangiocarcinoma	QBC939, Sk-ChA-1, and MZ-ChA-1	↓G1/S and G2M phases ↓caspase-3 activity
9)	Lung carcinoma	A549	iNOS, JAK, STAT 1 & 3 p38 MAPK
10)	Human pancreatic cancer	BxPC-3 & Panc-1	↓c-Myc, COX-2, cyclin D1, survivin, Bcl-2 and Bcl-xL ↑caspase-3 activity
11)	Human lung cancer	H460	↑Aldh1A1, RhoA, Rock ↓p21
In vivo studies			
1)	Colon cancer	AOM induced ACF, Formation in F344 rats	↓Preneoplastic lesions, ACF formation
2)	Hepatocarcinoma	H22 tumors on nude mice	↓43.5 % tumor inhibition
3)	Human pancreatic cancer	BxPC-3 nude mice	↓Reduced tumor volume
4)	Human lung cancer	NNK induced lung cancer in A/J mice	↓40-53 % lung tumor inhibition

1.4. Apoptoz

Vücudumuzdaki tüm hücrelerin bir yaşam döngüsü vardır. Her hücre doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Bu olaylar bir denge halinde devam etmektedir.[36] Apoptoz köken olarak Yunanca'dan gelmektedir. Apo(=ayrı) ve ptozis(=düşen) kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan kelimedir.[37] Apoptozis, ilk kez 1970 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından hücrenin fizyolojik ölümü olarak tanımlanmıştır.[38]

Apoptozu kapsamlı olarak tasvir edecek olursak; belirli bir uyarana maruz kaldıktan sonra ihtiyaç duyulmayan, fonksiyonları bozulan, biyolojik görevini tamamlamış ya da hasarlanmış olan hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan, programlı hücre ölümüdür. Apoptozis, doku homeostazında ve zararlı hücrelerin uzaklaştırılmasında görev almaktadır. Hücre ölümünün hem artışı hem de yetersizliği, bazı hastalıklara sebep olabilmektedir. Kanser ile apoptozun doğrudan ilişkili olduğu saptanmıştır. Kanserde,

hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki denge bozulmakta ve hücreler apoptozu gerçekleştirecek ölüm sinyallerini alamamaktadırlar.[39] Apoptozis bazı etkenler tarafından oluşabilmektedir. Apoptozisi uyaran etkenleri, hücre hasarı veya anormalliği, trofik faktörlerin geri çekilmesi ve eksternal aktivatörler olarak 3 başlıkta incelenir.

Hücre hasarı veya anormalliği: İskemi, toksik ajanlar, radyasyon, neoplaziler ve yaşlılık.

Trofik faktörlerin geri çekilmesi: nörotrofinlerin ortamda bulunmaması ve büyüme faktörleri apoptoza sebep olur.

Eksternal aktivatörler: diğer gruptan farklı olarak hücrelerde özellikle apoptozisi uyarırlar. Bunlar arasında glukokortikoidler ve viral enfeksiyonlar sayılabilir.[40]

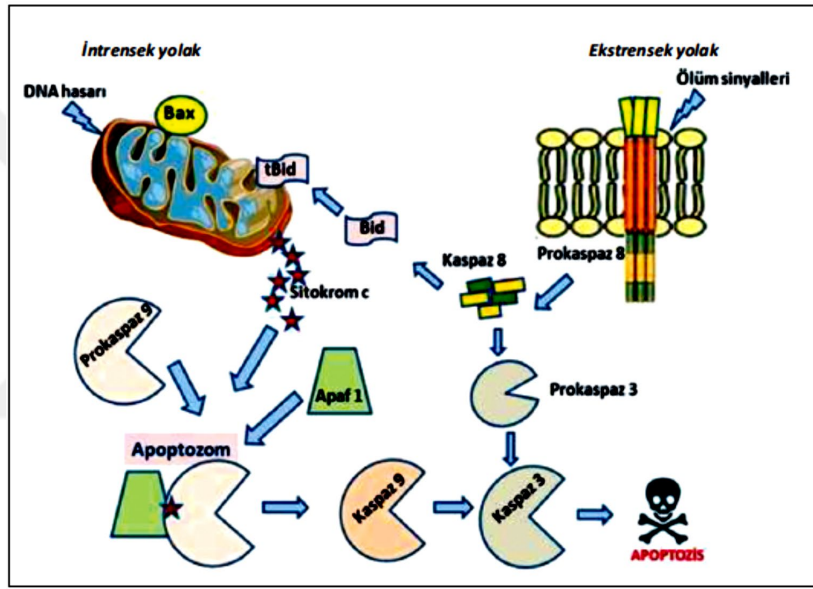
1.4.1. Apoptoz mekanizmaları

Apoptozun iki temel mekanizması vardır. Bunlar, ölüm reseptörlerine ölüm ligandlarının bağlanması ile aktive edilen ekstrinsik yolak ve hücre içi sinyaller sonucu aktive olan intrinsik (Mitokondriyal) yolaktır. Her iki yolakta bir seri kaspazı aktive ederek anahtar hücre proteinleri hedefler ve bu hücreleri parçalar.[39]

İntrinsik yolak; proapoptotik proteinlerden olan Bid, bir antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive eder. Bax ve Bak'ı aktive etmesinin ardından, mitokondriyon membranında por oluşumunu indükleyip zar potansiyelini değiştirir. Zar potansiyelinin değişmesinin sonucunda, mitokondriyon membranındaki porlardan sitokrom-c, Smac (second mitochondria-derived activator of caspase), Endo-G, Ca⁺⁺ ve AIF (apoptoz indükleyici faktör) salınımını uyarır. Sitokrom-c, Oksidatif fosforilasyon için gerekli olan elektronu taşır. Smac IAF (inhibitör apoptotik faktör)'ü inhibe edip apoptozu hızlandırır. Bu esnada ortamda IAF olduğundan dolayı, kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonu engellenir. AIF çekirdeğe geçerek onu parçalara ayırır. Endo-G'nin görevi ise DNA'yı parçalamaktır. Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, Apaf-1(apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin olmasıyla sitozolde apoptozom denilen bir kompleks oluşturmaktadır. Apoptozom, kaspaz-9'u, kaspaz-9 ise prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de ICAD (inaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD'ı serbestleştirir. CAD'ın serbest kalması, çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nükleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına sebep olmaktadır.

Ekstrinsik yolak; burada reseptörler trimer yapı kazanır. Bunun sebebi; ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa, TRAIL), hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5) entegre olmasıdır. Bu şekilde trimerik yapı kazanan reseptör, adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek DISC denilen yapıyı oluşturur. Ardından, inaktif durumdaki prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları kesilerek aktif kaspaz-8'in oluşması sağlanır. Doğrudan ve dolaylı yollar ile kaspaz-3, aktif kaspaz-8 ile aktive olur. Her iki yol ile aktif olan kaspaz-3 yine CAD aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna neden olur.[40]

Şekil 1.4. Apoptotik yollar[39]



Bid ve bax: B hücre lenfoma-2 (Bcl-2) ailesi üyeleri; t-Bid'in c-terminal bölgesinin kesilerek oluşan aktif formu; Apaf-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1; Apoptozom: dATP, sitokrom-c ve Apaf-1'den oluşan çoklu protein kompleksi.

1.4.2. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler

1.4.2.1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri

Işık mikroskobu kullanımı

Hematoksilen boyama: Hem hücre kültürü hem de doku boyamaları için kullanılır. Apoptotik hücre saptanması için ilk metod olarak kullanılması, oldukça elverişli ve avantajlıdır. Boyamada kullanılan hematoksilen boyası, kromatini boyadığı için apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirme alınır. Hücre küçülmesi “cell shrinkage”, sitoplazmik küçülme “cytoplasmic shrinkage”, kromatinin kondanse olması “nuclear condensation” ve nükleus zarının periferinde toplanması, nükleusun

küçülmesi “pyknosis” veya parçalara bölünmesi “nuclear fragmentation” hematoksilen boyama ile gözlenebilen değişikliklerdir.

Giemsa boyama: Hematoksilen boyamada olduğu gibi nukleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Giemsa boyamanın hematoksilen boyamadan tek farkı sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilir.[42]

Floresan mikroskobu / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı

DNA’ya bağlanabilen floresan boyalar sayesinde hücrenin kromatini yani nukleusu görünür hale gelebilir. Bu boyalar hücre kültürü çalışmasında kullanılırsa canlı ve ölü hücre ayrımı yapılmasına olanak sağlar. Giemsa ve hematoksilen boyamanın kullanıldığı örnekler yöntem prensibi gereği ölmektedir. Canlı ve ölü hücreleri ayırmak için 2 farklı boya kullanılır. Biri (örn: Hoechst boyası) canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen boya diğeri (örn: propidium iyodür) ise sadece ölü hücreleri boyayabilen boyadır. Bu yöntemlerde canlılığın belirleyicisi, hücrenin plazma membranının intakt (canlı) olup olmadığıdır. Canlı olan hücreler propidium boyası gibi boyalarla boyanamazlar çünkü bu boyalar sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyamaktadır. Hoechst boyası ise tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı ayırımını sağlar. Bu yöntemle boyanan hücreler floresan mikroskobu ile tanımlanabilir.[43]

Elektron mikroskobu kullanımı

Apoptozis için kullanılacak en değerli yöntemdir. Hücrede gözlemlenebilen morfolojik değişikliklerin en doğrusunu gösterdiği yöntemdir. Bunlara ek olarak subselüler detaylarda incelenebilir (mitokondri durumu, hücre zarı ya da nukleus membran bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi). Nukleus fragmentasyonu, apoptotik hücre ile normal hücre kıyaslaması ve kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu elektron mikroskobu ile izlenebilmektedir.[42,44]

Faz kontrast mikroskobu kullanımı

Faz kontrast mikroskobu sadece hücre kültürü çalışmalarında kullanılır. Flask veya plate’lerde hücrelerin büyütüldüğü ve içerisindeki hücreleri ya da hücre topluluğunu inceleyebilmeye olanak sağlar.[43]

1.4.2.2. İmmunohistokimyasal yöntemler

Anneksin V yöntemi

Fosfatidilserin (PS), apoptoza uğramamış hücrelerin hücre membranlarının sitoplazmik yüzünde görülür. Hücre apoptoza giderse iç yüzeye yerleşen PS molekülleri hücre zarının dış yüzeyine transloke olurlar. Böylece dış yüzeydeki PS'ler floresan bir madde (FITC gibi) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale gelir. FITC-Anneksin V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülür. Anneksin V-FITC (green fluorescence) ve non-vital boya olan propidium iodide ile aynı anda boyanan hücreler, canlı hücreler(FITC+PI-), erken apoptotik hücreler(FITC+PI+) ve geç apoptotik hücreler(FITC+PI+) birbirinden ayırt edilebilir.[42,43,45]

TUNEL yöntemi

DNA kırıklarının, in situ (ilk yerinde) olarak tanınmasını sağlar. Apoptotik kırılmalar sonucunda DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenir. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya platalere ekilmiş ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı bu metodla yapılır. "TdT-dUTP nick-end-labelling" sözcüklerinin kısaltılmasıyla "TUNEL" adını almıştır.[43]

M30 yöntemi

M30 yöntemi prensibi, apoptotik hücreler sitokeralin 18'in kaspazların etkisi sebebiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immünohistokimyasal yöntemle boyanmasıdır. Sadece epitelyal kaynaklı dokular kullanılır çünkü sitokeratin 18'i eksprese eden dokular olmak zorundadır.[42]

Kaspaz-3 yöntemi

Apoptotik hücrelerde oluşan kaspaz-3 belirlenebilir. Belirlenebilmesi için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi veya çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırıp kırmadığı bilinmelidir.[44,46]

1.4.2.3. Biyokimyasal yöntemler

Agaroz jel elektroforezi

DNA’da oluşan kırıklar, Agaroz jel elektroforezi ile görülmektedir. Apoptoziste DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarında olan noktalardan (internukleozomal bölgelerden) kırılır. Bu kırılmayla oluşan yapıya, merdiven görüntüsü “ladder pattern” denir. Bu apoptozisin karakteristik özelliğidir. Nekrozdan ayırımı bu şekilde yapılır.[42]

Western Blotting

İmmunblotlama da denilen bu yöntem, bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü tespit etmek için kullanılır. Bu metod sayesinde, apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn: bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn: kaspaz-3) saptanması yanı sıra sitokrom c ‘nin mitokondriye çıkıp çıkmadığı da belirlenebilir. Sitokrom c tespiti yapılmadan önce, alt fraksiyonlama yapılarak hücreler mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonlarına ayrılırlar. Sonrasında normalde sitoplazmik fraksiyonda olması beklenmeyen sitokrom c ‘nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptoza gittikleri anlaşılır.[43]

Flow Sitometri

Lazer kaynaklı florometre ile parçacık ışık yayılımı analizi birleşiminden oluşur. Bu yöntemde, farklı moleküller, hücreler ve parçacıklar, düşük ve dik açılı ışık yayılımı kullanılarak büyüklük ve şekil bakımından ayrılabilir. Hücreler, moleküller vya da parçacıklar 13-phycoerithin, FITC ve rhodamine-GG gibi özel floresan işaretleyicilerle işaretlenebilir. Bu yöntem yardımıyla, floresan madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteini saptanabilir. Apoptoz flow sitometride iki şekilde belirlenir: 1. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak, 2. Anneksin V kullanılarak.[42-44]

1.4.2.4. İmmünolojik yöntemler

ELISA

ELISA, apoptozun belirlenmesinde kullanılan bir serolojik tanı yöntemidir. Apoptozun ilk olayı, nükleozomlatın salınması ve arkasından olan DNA fragmentasyonudur. ELISA yöntemi ile kültürü yapılmış popülasyonlarda DNA

fragmentasyonu saptanır ve M30 düzeylerinin ölçümü yapılabilmektedir. ELISA yöntemi temeli, antijen-antikor kompleksine bir enzimle işaretli antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor var ise renk oluşumunun gözlenmesidir.[42,43]

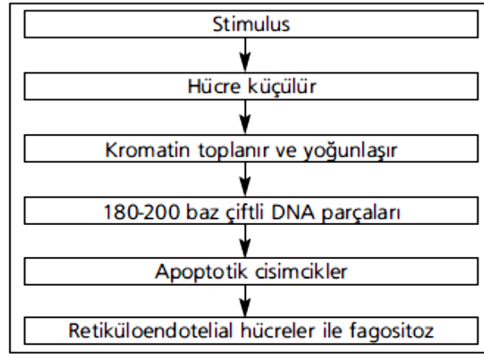
Fluorimetrik Yöntem

Kültürü yapılan hücrelerin kaspaz aktivitesini tayin etmek amacıyla kullanılır. Fluorimetrik yöntemde, ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu "plate"lere hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur ve ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi bulunur.[42,43]

1.4.3. Apoptoz ve nekroz farkları

Apoptoz ile nekroz birçok özellik açısından oldukça farklı bir hücre ölüm mekanizmalarıdır. Apoptozis, hem fizyolojik hem patolojik şartlarda meydana gelirken nekrozis, fizyolojik bir ölüm şekli değildir. Apoptozun morfolojik olarak kendine özgü bir yapısı vardır. Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişer fakat apoptozda tam tersine hücre küçülür. Nekroziste, kromatin paterni yaklaşık normal hücredeki görüntüye benzer olmasına rağmen apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına doğru hücre içi materyal çıkışı gerçekleşir. Apoptotik hücrede ise hücre membranı intakttır ve üzerinde küçük cepçikler oluşur. Apoptotik hücre hüçük cisimlere parçalanırken nekrotik hücre lizise uğrar. Nekroziste hücre içeriği dış ortama salındığından enflamasyon reaksiyonu uyarılır fakat apoptoziste apoptotik hücre komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden enflamasyon oluşmaz.[36]

Şekil 1.5. Apoptozun morfolojik görünümü[36]



Tablo 1.3. Apoptoz ve nekrozun kıyaslaması[41]

ÖZELLİK	APOPTOZ	NEKROZ
Yol açan nedenler	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Büyüme faktörü eksikliği, ✓ Hücre yaşlanması, ✓ HIV, ✓ Kanser ilaçları, ✓ Radyasyon, ✓ Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, ✓ Sitotoksik T lenfositler 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ İskemi, ✓ Hipertermi, ✓ Hipoksi, ✓ Litik viral enfeksiyon, ✓ Toksik maddeler, ✓ Ağır metaller, ✓ Şiddetli oksidatif stres
Morfolojik özellikleri	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hücre membranı sağlamdır. ✓ Hücre küçülür. ✓ Biebler oluşur. ✓ Kromatin kondensasyonu gerçekleşir. ✓ Organeller sağlamdır. ✓ Apoptotik cisimcikler oluşur. ✓ Erken evrede fosfatidil serin translokasyonu gözlenir. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hücre membran bütünlüğü kaybolur. ✓ Hücre şişer. ✓ Büyük vakuoller oluşur. ✓ Organeller parçalanır. ✓ Hücre lizisi gerçekleşir. ✓ Fosfatidilserin translokasyonu yoktur.
Biyokimyasal özellikleri	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Programlıdır. ✓ ATP gerektirir. ✓ DNA kırıkları merdiven şeklini alır. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ İyon dengesi bozulur. ✓ ATP gerekmez. ✓ DNA rastgele parçalanır.
Diğer özellikler	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür. ✓ Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir. ✓ Makrofajlar tarafından fagosite edilirler. ✓ Enflamasyon görülmez. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hücreler gruplar halinde ölür. ✓ Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir. ✓ Lizozomal enzimler salınır. ✓ Enflamasyona neden olur.

1.5. Sitotoksisite

Sitotoksisitenin sözcük anlamı, canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranıdır. Sitotoksisiteyi genel olarak tasvir edersek, moleküler olaylar sonucu birçok sayıda ve çeşitli makromoleküllerin sentezlenmesinin engellenmesi ve bununla birlikte hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında gözle görülür hasarlar meydana gelmesidir. Uygulanan materyalin hücrenin yaşamına olan etkisi ve biyouyumluluğu sitotoksisitede belirleyici faktördür. Burada hücreler sitotoksik maddeyle etkileşime girerse apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucunda ölebilir veyahut sitostazis sebebiyle proliferasyon özelliklerini kaybederler.[47,48] Yapılan sitotoksisite çalışmalarının çeşidi ne olursa olsun mühim olan çalışma sonucundaki canlı ve ölü hücre miktarının belirlenmesidir. Sitotoksisite testleri, toksik olduğu düşünülen maddenin elverişli hücre kültüründe hücre çoğalma oranı ve hücre üzerindeki toksik etkisi dikkate alınarak değerlendirme yapılan testler olarak tasvir edilmektedir. Sitotoksisite testleri: hücre canlılığı ve ölümü, hücre membranı, hücre organelleri, protein veya DNA sentezi ve hücre bölünmesi ile ilgili bilgiler vermektedir. Sitotoksisite testlerinin yapılma maksadı, morfolojik olarak hücre hasarın gözlenmesi, hücre hasarın çeşitli ölçüm yöntemleri ile belirlenmesi, hücre büyümenin belirlenmesi ve hücre metabolizmadaki herhangi bir değişikliğin belirlenmesidir.

Sitotoksisite testleri *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere 2 farklı yöntem ile uygulanmaktadır. *In vitro* testler, sitotoksisitesi araştırılan madde artan konsantrasyonda hücrelere uygulanır ve bu maddenin hücre morfolojisi ve hücrelerin yaşama oranları üzerine etkileri araştırılır.

Sitotoksisite değerlendirme yöntemleri 4 başlık altında incelenmektedir. Bunlar:

1. Canlılık (viability) değerlendiren testler: Kısa dönemde, toksik etki sonucunda kültürde canlı kalan hücre oranının belirlenmesinde kullanılmaktadır.
2. Yaşam (survival) değerlendiren testler: Uzun dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkilerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır.
3. Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler: Kültür içerisindeki hücrelerin birkaç gün sonraki sayımı materyalin çeşitli bileşenlerinin hücre proliferasyonuna etkisinin belirlenmesi için kullanılmaktadır.
4. Metabolik sitotoksisite değerlendirme testleri: Bu testler doğrudan hücre yaşam değerlendirmesi için kullanılmamaktadır. Hücre sayısındaki artış, total protein

miktarı veya DNA artışı belirlenebilmektedir. Bu testler ile tetrazolyum tuzunun formazon kristaline indirgenmesi ya da DNA veya protein sentezi saptanarak metabolik aktivite belirlenebilmektedir.

Sitotoksosite testleri:

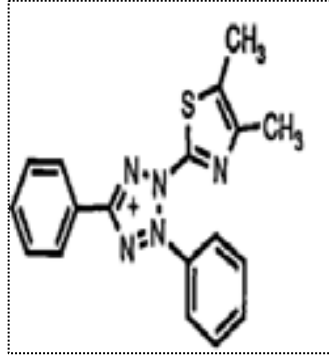
- Nötral kırmızı testi
- Tripan mavisi testi
- Alamar mavisi testi
- Sülforodamin B
- ³H-timidin testi
- MTT, XTT, WST testleri
- Laktat dehidrojenaz testlerini içermektedir.[47-49]

1.5.1. MTT Kolorimetrik sitotoksosite testi

Sitotoksosite testlerinde en yaygın kullanılan enzimatik bir test olan MTT (tetrazolium tuzu 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testidir. MTT testi ile hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak belirnebilmektedir. MTT, pozitif yüklü bir birleşiktir ve ökaryot hücrelerin membranını kolaylıkla geçerek hücre içinde indirgenebilir. Fakat indirgenme sonucu oluşan formazan, suda çözünmez niteliktedir ve kristal şeklinde çökelmektedir. MTT testinin prensibi, sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesidir. Bu halkanın parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. MTT testinin sonucunda, canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mavi-mor renkte boyanırken ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır.[47, 49-51]

Canlı hücre sayısındaki herhangi bir artış veya azalma, 540 ve 720 nm'de bir plaka okuyucu kullanılarak optik yoğunlukta (OD) yansıtılan formazan konsantrasyonunun ölçülmesiyle saptanabilir. İlaç duyarlılığı ölçümleri için, ilaçlarla inkübe edilmiş hücrelerin bulunduğu oyukların OD değerleri, ilaçlara maruz bırakılmayan hücrelerin bulunduğu oyukların OD'si ile karşılaştırılır.[51]

Şekil 1.6. MTT bileşiğinin kimyasal yapısı[49]



1.6. Nanobilim ve Teknoloji

Nano, herhangi bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri anlamına gelmektedir.[52] Nanobilim, metrenin bir milyarda biri olan nano boyutta maddenin farklılaşan fiziksel ve kimyasal özelliklerini anlamayı sağlayan bilimdir. Nanoteknoloji ise milyarda bir birimde atomlar ve moleküller seviyesinde (1-100nm aralığı) çalışarak, geliştirilmiş veya tamamen yeni fiziksel, kimyasal, biyolojik özelliklere sahip yapıların ortaya çıkarılmasıdır. Başka bir deyişle, nano boyutta yeni yapılar tasarlayarak veya yapıları yeni özellikler kazandırarak çeşitli alanlarda kullanmayı hedefleyen teknolojidir.[53,54]

Nanoteknolojinin amaçlarını sıralayacak olursak:

- Nanometre boyutunda yapıların fiziksel özelliklerinin anlaşılması,
- Nanometre ölçekli yapıların analizi,
- Daha dayanıklı, daha aktif, daha hızlı yapılar,
- Daha az malzeme ve enerji kullanımı olarak sıralanabilir.

Nanobilim ve nanoteknoloji alanındaki çalışma ve araştırmalar her geçen gün hız kazanmakta ve günlük yaşam içerisinde kullanılmaktadır. Nanoteknolojik ürünler, sağlık, ilaç sanayi, tekstil, elektronik, otomotiv, gıda, boya gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Örneğin, günümüzde kullanılan ilaçlar genellikle tüm dokulara homojen dağılmakta ve vücudun lokal bir bölgesini tedavi etmesi gerekirken tüm vücudun kritik iç organlarını, karaciğer, böbrek gibi organlara yan etki yapmaktadır. Görüldüğü gibi bu yöntemin birçok dezavantajı vardır. Bu yöntem yerine, nanopartiküller kullanılan ilaçlar kullanılırsa, ilacın doğrudan etki etmesi istenilen hasta bölgeye ya da hasta dokuya direkt gönderilebilmektedir. Nanobilim ve teknoloji sağlık alanında da aktif olarak kullanılmaktadır. Kanser teşhislerinde büyük rol oynamaktadır. Nanoteknoloji

yardımıyla tümörler erken dönemde teşhis edilebilmektedir. Kullanılan nanoyapıların tek bir tümör hücresine bile girebilecek durumda olması görüntüleme tekniklerinin limitlerini arttırmaktadır. Örneğin, meme kanseri teşhisinin konulması için 1.000.000. tümör hücresi olması gerekirken, nanoteknoloji sayesinde 100'den az tümör hücresinin oluşturduğu durumda bile meme kanseri teşhis edilebilmektedir.[52,55]

Nanoteknolojide kullanılan malzemelerin boyutu 100 nm'nin altına indiğinde yığın hallerinden bağımsız olarak farklı özelliklere sahip olurlar. Örneğin, yığın olarak bulunan altın 1064°C'de erirken, altından elde edilen nanopartiküller yaklaşık 300°C'de erimektedir. Nanoteknolojide tek bir çeşit nano malzeme kullanılmamaktadır. Nanobilim ve teknolojide kullanılan nano malzemeler: nanopartiküller, karbon nanotüpler, lipit nanotüpler, nanokompozitler ve nano kristallerdir.[56]

1.7. Nanopartiküller

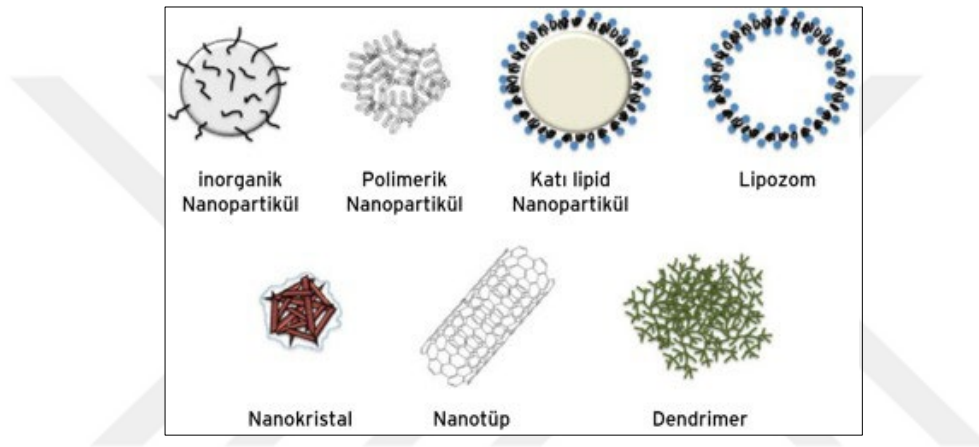
Nanopartiküller, boyutları 0,1 nm ve 100 nm arasında kalan tozlar olarak tanımlanmakta ve nanoboyutlu malzemelerin ve böylece nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadırlar. Bir partikülü nano ölçekli olarak adlandırabilmek için en az bir boyutunun 100 nm'den küçük olması gerekir.[57,58] Nanoparçacıklar veya nanopartiküller ayrıca "sıfır boyutlu" nanomalzemeler olarak da adlandırılmaktadır.[59] Nanopartiküller diğer kullanılan ticari malzemelerden farklı ve üstün olan özellikler içermektedirler. Örneğin, kuantum boyut etkileri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının benzersiz karakterleri ve yüksek yüzey/hacim oranı gibi. Nanoparçacıkların yüzey alanı/hacim oranının mikropartiküllere göre çok yüksek olması hem in vitro hem in vivo çalışmalarında daha çok tercih edilmesini sağlamıştır. Nanopartiküller kanser teşhis ve tedavisinde, hedefli ilaç salımında, biyosensörler gibi tıp ve biyoteknoloji alanlarında oldukça sık kullanılmaktadır[58,60]. Son yıllarda nanopartiküller oldukça geniş alanlarda kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin geliştirilmesinin ve kullanılmasının sebepleri şunlardır:

1. Advers ilaç reaksiyonlarının toksisitesini ve oluşumunu azaltır.
2. Daha iyi ilaç kullanımı sağlar.
3. İlaç salınım hızını ve yerini kontrol eder.
4. Daha öngörülebilir bir ilaç dağıtım sistemi sağlar.
5. Daha fazla kolaylık ve daha iyi hasta uyumu sağlar.

6. İlacın terapötik (ilacın birim doz başına genel farmakolojik yanıtı) etkisini artırır.
7. Tekrar üretilebilir.
8. Dondurularak kurutulabilir, böylece kuru formda elde edilebilir.
9. Toksik değildir ve biyobuzunurdur[61].

Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan yapılar, nanokristaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar gibi farklı sınıflara ayrılmış olsa da tümüne nanopartiküller sistemler denilmektedir.[60]

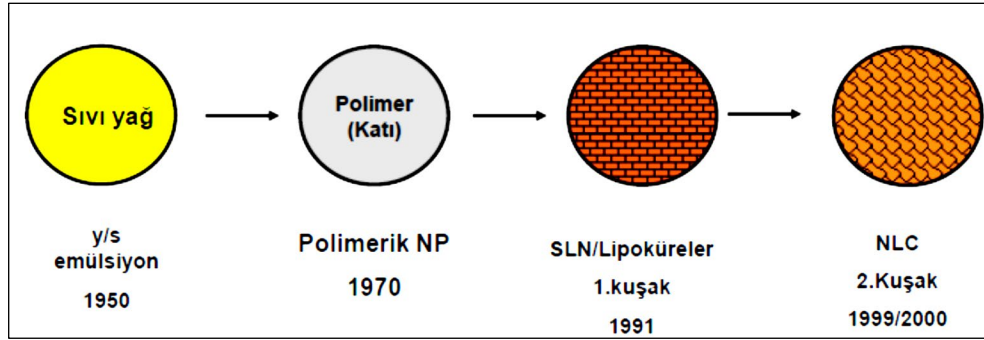
Şekil 1.7. Nanopartikül sistemleri[60]



1.7.1. Katı lipid nanopartiküller (KLN)

Katı lipid nanopartiküller (KLN'ler), suda veya sulu bir yüzey aktif cisim çözeltisi içinde dağılmış bir fizyolojik lipitten oluşan mikron altı kolloidal taşıyıcılardır[62]. KLN'ler 50-1000 nm arasında, biyoparçalanabilen ve biyoyumlu katı lipidlerin yüzey etken maddeler ile stabilize edildiği bir sistemdir[63]. Katı lipid partiküller, 1990'ların başında emülsiyonlar, lipozomlar ve polimerik partiküler sistemlere alternatif taşıyıcı sistemler olarak geliştirilmeye başlanmıştır[64].

Şekil 1.8. Katı lipid partiküllerin gelişimi[64]

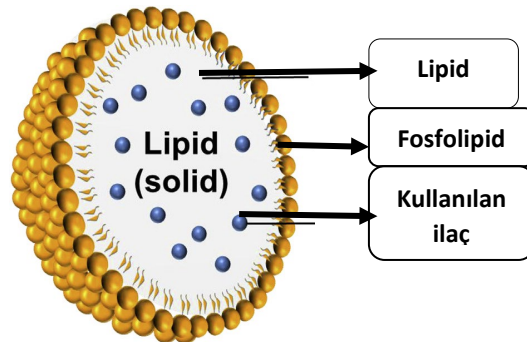


KLN'ler tipik olarak katı lipid (ler), sürfaktan (lar), ko-sürfaktan (isteğe bağlı) ve aktif bileşenlerden (tipik olarak ilaçlar) oluşmaktadır[65]. Katı lipitten yapılan nanopartiküller, lipofilik özellikteki etkin maddelerin parenteral, oral ve topik uygulanabilmesini sağlamaktadır. KLN'ler genel olarak oda ve vücut sıcaklığında katı olan ve biyolojik olarak biyobozunabilen lipidlerle hazırlanmaktadır[66]. Katı lipid nanopartiküllerinin lipid matriksini, gliseritler (trilaurin, tristearin, trikaprin), yağ asitleri (stearik asit, behenik asit), kolesteril asetat ve mumlar oluşturmaktadır. KLN'ler, etkin maddelerin absorbe edilme ve vücut içindeki etki yerine ulaşma hızını (biyoyararlanım) arttırmak, duyarlı etkin maddelerin yapılarını korumak ve lipofilik etkin maddelerin kontrollü salınım sistemlerini oluşturmak için hazırlanmaktadır[67].

1.7.1.1. Katı lipid nanopartiküllerin yapısı

Temel olarak, KLN'ler tek tabakalı fosfolipid bir kabuğa sahip katı bir lipid çekirdekten yapılmaktadır ve fosfolipidlerin lipofilik kısmı, lipid matriksine gömülüdür[68].

Şekil 1.9. Katı lipid nanopartiküllerin temel yapısı[68]



Katı lipid nanopartiküller temel olarak bu yapıda gösterilse de, aslında tek bir yapıda olmayıp dahil edilen ilaç molekülünün konumuna bağlı olarak üç farklı morfolojiye sahiptir[65].

- İlaçla zenginleştirilmiş kabuk modeli
- İlaçla zenginleştirilmiş çekirdek modeli
- Homojen Matris Modeli (Katı çözelti modeli)

Şekil 1.10. Katı lipid nanopartiküllerin ilaç katılma modelleri: a) İlaçla zenginleştirilmiş kabuk modeli b) İlaçla zenginleştirilmiş çekirdek modeli c) Homojen matris modeli[69]



- İlaçla zenginleştirilmiş kabuk modeli

İlaçla zenginleştirilmiş kabuk modeli, ilaçla zenginleştirilen bir dış kabukla çevrili bir lipid çekirdeğidir. Bu yapı, sıcak sıvı damlacıkları faz ayrılmasının bir sonucu olarak lipid nanoparçacıkları oluşturmak üzere hızla soğuduğunda elde edilmektedir. Bu kabuk modelinin morfolojisi, üretim sırasında ortaya çıkan bir lipid çökeltme mekanizması ve soğutma aşamasında meydana gelen ilacın yeniden bölümlendirilmesiyle olmaktadır. Burada kullanılan yöntem olan sıcak homojenizasyondan sonra her damlacık eritilmiş lipid ve ilacın bir karışımıdır. Hızlı soğutma, dış sıvı lipitte ilaç konsantrasyonunda eşlik eden bir artışla çekirdekte lipid çökmesini hızlandırmaktadır. Tam soğutma, ilaçla zenginleştirilmiş kabuğun çökmesine yol açmaktadır[65]. Bu yapısal model, bir patlama olarak salınan ilaçların dahil edilmesi için oldukça uygun bir modeldir. Böyle bir hızlı salınım, katı lipid nanopartiküllerin oklüzif etkisine ek olarak, artan ilaç penetrasyonu gerektiren dermatolojik KLN formülasyonları için oldukça istenilen bir durumdur. İlacın sürfaktan-su karışımındaki yüksek sıcaklıklarda çözünürlüğü, ilacın kabukta çökmesini etkileyebilen başka bir faktördür. Sıcak homojenizasyon işlemi sırasında, yüzey aktif cismi çözeltisindeki çözünürlüğünün artması nedeniyle ilaç kısmen lipid çekirdeğinden dışarı çıkar. Bununla birlikte, dispersiyon soğutulduktan sonra ilacın sürfaktan çözeltisi içindeki

çözünürlüğü azalır. Bu, lipit çekirdeği katılaşmasının halihazırda başladığı durumlarda kabukta ilaç zenginleşmesine yol açmaktadır.[69,70]

- İlaçla zenginleştirilmiş çekirdek modeli

Yeniden kristalleşme mekanizması, ilaçla zenginleştirilmiş kabuk modeli için tarif edilenin tersi olduğunda, ilaçla zenginleştirilmiş bir çekirdek modeli elde edilmektedir. İlaçla zenginleştirilmiş çekirdek modeli, lipit eriyikindeki aktif bileşen konsantrasyonu yüksek olduğunda ve doyma çözünürlüğüne yakın olduğunda gerçekleşebilmektedir. Bu morfoloji, ilacın lipitten önce kristalleşme eğilimi gösterdiğinde elde edilmektedir. Kızgın yağ damlacıklarının soğutulması çoğu durumda aktif maddenin eriyik içindeki çözünürlüğünü azaltmaktadır. Doygunluk çözünürlüğü aşıldığında, aktif moleküller çökeler ve ilaçla zenginleştirilmiş bir çekirdek oluşumu ortaya çıkar.[65,69]

- Homojen Matris Modeli

Homojen matris modeli olarak da adlandırılan katı bir çözelti modeli, ilaç moleküllerde veya amorf kümelerde lipit matrisinde homojen olarak dağıldığında elde edilir. Bu model genellikle soğuk bir homojenizasyon tekniği ile hazırlanan lipit nanoparçacıklar, yüzey aktif maddeler veya ilaç çözüldürücü moleküller kullanılmadan sıcak bir homojenizasyon tekniği kullanılabilecek şekilde yüksek derecede lipofilik ilaçlar eklenen model olarak tarif edilebilmektedir. Soğuk homojenizasyon tekniği kullanıldığında, çözüldürülmüş ilaç dökme lipit içinde dağıtılır. Yüksek basınçlı homojenizasyona tabi tutulduğunda, mekanik çalkalama, homojen bir matris ile lipit nanoparçacıkların oluşumuna yol açar. Sıcak bir homojenizasyon tekniği ile üretilen lipit damlacıkları hızla soğutulduğunda benzer bir sonuç elde edilir; damlacıklar kristalleşme eğilimindedir ve ilaç ile lipit arasında faz ayrımı yoktur. Homojen matris modeli, parçacıklardan uzun süreli salınım sergileyen ilaçların dahil edilmesi için uygundur.[65,69]

Tablo 1.4. Katı lipid nanopartiküllerin ilaç uyum modellerini karşılaştırma[71]

Homojen matris modeli	İlaçla zenginleştirilmiş kabuk modeli	İlaçla zenginleştirilmiş çekirdek modeli
Soğuk homojenizasyon tekniğiyle oluşumu	Sıcak homojenizasyon tekniğiyle oluşumu	Dispersiyon soğutması, lipitte çözünen ilacın aşırı doygunluğuna yol açar.
İlaçta çözünen yüzey aktif madde kullanılmaz.	Lipidin yeniden kristalleşme sıcaklığında lipit çekirdeğinin oluşumu	Erimiş lipitte ilacın dağılışı
İlaç lipit matrisinde dağılmıştır.	Elde edilen dispersiyonun soğutulması, ilacın lipit fazına yeniden bölünmesine yol açar.	Son olarak, daha fazla soğutma lipitin yeniden kristalleşmesine yol açar.
Lipid ve ilaç arasında güçlü bir etkileşim vardır.	Çevreleyen zarda ilacın konsantrasyonu	İlaça zenginleştirilmiş çekirdek oluşumu.

1.7.1.2. Katı lipid nanopartiküllerin kullanım alanları

İlaç verilmesi için lipit nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde uygulanması, çeşitli anatomik bariyerlere nüfuz etme yeteneklerine, içeriklerinin sürekli salınmasına ve nanometre boyutundaki stabilitelere bağlıdır. KLN, küçük boyut, geniş yüzey alanı, fazların ara yüzlerde etkileşimi gibi benzersiz özellikler sunar ve ilaçların, nötrasötiklerin ve diğer malzemelerin performansını artırma potansiyeli nedeniyle avantajlıdır. İlaç ekleme ve bırakma, potansiyel ilaç taşıyıcı sistemlerinin tasarımında, geliştirilmesinde ve değerlendirilmesinde önemli bir araçtır[61]. Bununla birlikte, KLN'ye ilacın dahil edilmesi ile ilgili birçok çalışma vardır. Salım mekanizmaları hakkındaki veriler halen az olsa da, katı lipid nanopartiküller, ilaçların biyoyararlanımlarını arttırmak ve lipofilik ilaçlar için kontrollü salım testi olarak kullanılabilir[66]. KLN'lerin farklı kullanım alanları da vardır. Örneğin, KLN, moleküler güneş kremleri gibi kozmesötiklerin dermal uygulaması ve UV blokerleri için taşıyıcılar olarak kullanılmıştır. Lipid nanopartiküllerinin kozmetik yararları arasında aktif maddelerin kimyasal stabilitesinin artırılması, ciltte film oluşumu, kontrollü tıkanma, cilt hidrasyonu, ilaç hedefleme, gelişmiş cilt biyoyararlanımı ve lipit nanopartiküllerin topikal formülasyonlar olarak fiziksel stabilitesi bulunmaktadır. Buna ek olarak, bir in vivo çalışmada, geleneksel bir krem formülasyonuna % 4 KLN ilave edildikten 4 hafta sonra cilt hidrasyonunun %31 arttığı gözlemlenmiştir[72].

Bir başka kullanım alanı ise, aşular için potansiyel yeni adjuvan olarak KLN kullanımıdır. Adjuvanlar, bağışıklık yanıtını arttırmak için aşılama da kullanılır. Daha güvenli yeni alt birim aşular aşılama da daha az etkili olmasından dolayı daha etkili adjuvanlar gerekmektedir. Adjuvan alanındaki yeni gelişmeler emülsiyon sistemleridir. Bunlar vücutta hızla parçalanan su içinde yağ emülsiyonlarıdır. Katı haldeyken, KLN'lerin lipit bileşenleri, bağışıklık sistemine daha uzun süreli maruz kalma sağlayacak şekilde daha yavaş bozunmaktadır. Katı lipit nanopartiküller, kanser kemoterapisinde de kullanılmaktadır. Son yirmi yıldan beri, birkaç kemoterapötik ajan KLN içinde kapsüllenmiştir ve bunların in-vitro ve in-vivo etkinliği değerlendirilmiştir. Bu çalışmaların sonuçlarının kemoterapötik ilaçların etkinliğini arttırdığı, aynı zamanda bunlarla ilişkili yan etkilerin aynı anda azaldığı gösterilmiştir. İlaçların stabilitesinin artırılması, çeşitlendirilmiş fizikokimyasal özelliklerin kemoterapötik ajanlarının kapsüllenmesi, ilaç etkinliğinin artırılması, farmakokinetiğin iyileştirilmesi ve in vitro toksisitenin azaltılması, KLN'nin kemoterapötik ilaçların verilmesi için uygun bir taşıyıcı olmasını sağlayan önemli özelliklerinden olduğu görülmüştür. Normal doku toksisitesi, zayıf özgüllük, stabilite ve ilaca dirençli tümör hücrelerinin görülme sıklığı gibi antikanser bileşiklerle sıkça karşılaşılan bazı engeller, KLN kullanılarak bunların verilmesiyle en azından kısmen aşılmaktadır. Kolloidal partiküllerin RES(Retiküloendotelyal Sistem) makrofajları tarafından hızlı bir şekilde uzaklaştırılması, kemik iliği ve katı tümörler gibi vücudun başka yerlerindeki dokuları hedeflemenin önünde büyük bir engeldir[73].

1.7.1.3. Katı lipid nanopartiküllerin avantaj ve dezavantajları

Katı lipid nanopartiküller; lipozomların, emülsiyonların ve katı partiküllerin sağladığı avantajların birleşimini içermektedirler. KLN'ler, düşük sistemik toksisite ve düşük sitotoksisiteye sahip olmaları, organik çözücü kalıntısı içermemeleri, büyük ölçekte üretimlerinin mümkün olması gibi yağ emülsiyonlarının ve dokulara etkin madde hedeflenebilmesi gibi lipozomların avantajlarını taşımaktadırlar. İlâveten, katı lipid matrisleri sayesinde kontrollü etkin madde salımı ve kimyasal bozunmaya karşı etkin maddelerin korunması gibi katı polimerik nanopartiküllerin avantajlarına da sahiptirler[74].

KLN'lerin avantajlarını şu şekilde özetleyebiliriz:

- Kontrol ve / veya hedef ilaç salımı.
- Kolloidal büyüklükte olması
- Sulu dispersiyonları uzun süre stabil kalabilir.
- Lipofilik ve hidrofilik etkin maddeler hapsedilebilir.
- Mükemmel biyouyumluluk.
- Farmasötiklerin stabilitesini arttırır.
- Yüksek ve gelişmiş ilaç içeriği.
- Kapsüllenmiş bileşiklerin salım kinetiği üzerinde daha iyi kontrol.
- Tutulan biyoaktif bileşiklerin gelişmiş biyoyararlanımı.
- Kararsız birleşik bileşiklerin kimyasal koruması.
- Üretimi biyopolimerik nanoparçacıklara göre çok daha kolay.
- Özel bir çözücü gerekmez.
- Etkin maddenin kontrollü salınımı
- Ekonomik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı sistemdir.[73-75]

KLN'ler pek çok avantaja sahip olmalarına rağmen kullanımlarını sınırlayan, dezavantajları olarak sayılan faktörlerde vardır[74]:

- Parçacık büyümesi
- Öngörülemeyen jelleşme eğilimi
- Polimerik geçişlerin beklenmedik dinamikleri
- Dozlama sorunları
- KLN dispersiyonlarının su içeriğinin (%70- 99.9) yüksek olması
- Nispeten düşük etkin madde yükleme kapasitesi.[61, 72-75]

1.7.1.4. Katı lipid nanopartiküllerin sentez yöntemleri

Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemleri

Lipozomlar ve emülsiyonlar, yüksek basınçlı homojenizasyon ile kolayca ve büyük ölçekte üretilebilir. Aynı teknik katı lipid nanoparçacıkların veya nano-süspansiyonların üretilmesi içinde kullanılır. Yüksek basınçlı homojenizasyon (HPH), KLN'nin hazırlanması için güvenilir ve güçlü bir teknik olarak ortaya çıkmaktadır. Farklı boyutlardaki homojenizatörler, çeşitli üreticilerden makul fiyatlarla ticari olarak temin

edilebilir. Diğer tekniklerin aksine, ölçek büyütme çoğu durumda sorun oluşturmaz. HPH dar bir boşluktan (birkaç mikron aralığında) yüksek basınçlı (100-2000 bar) bir sıvıyı iter. Sıvı, çok yüksek bir hıza (1000 km / s'nin üzerinde) çok kısa bir mesafede hızlanır. Çok yüksek kesme gerilimi ve kavitasyon kuvvetleri, partikülleri mikron altı aralığa kadar parçalar. Homojenizasyonun iki genel yaklaşımı, sıcak ve soğuk homojenizasyon teknikleri KLN üretimi için kullanılmaktadır. Her iki durumda da, hazırlık aşaması ilacın emülsifikasyon süresi, ilacın lipit eriyik içinde çözülmesi veya dağılması gibi karıştırma hızı da dahil olmak üzere metre ile toplu lipit içine katılmasını içerir[61,71].

- *Sıcak homojenizasyon*

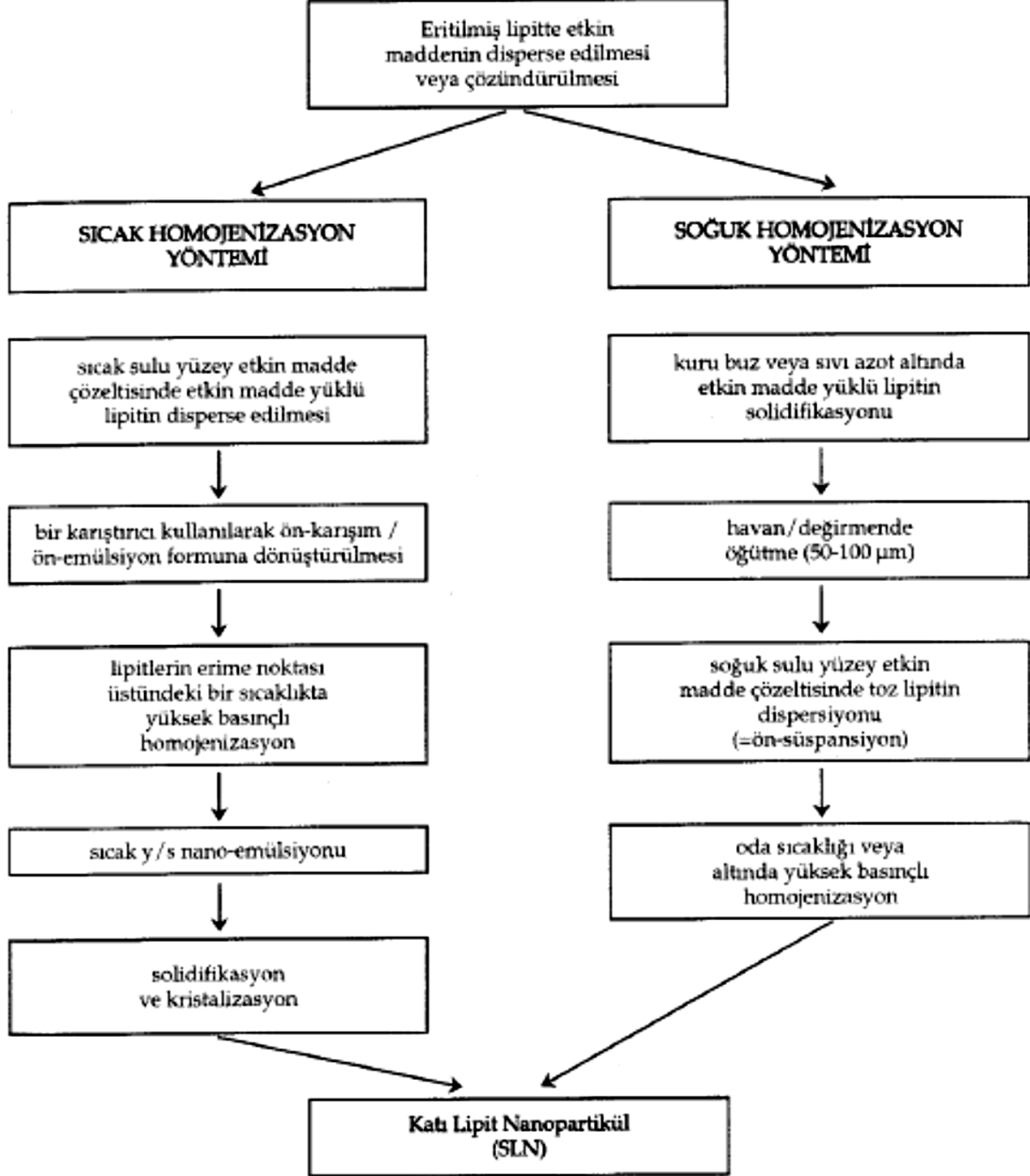
Sıcak homojenizasyon genellikle lipitin erime noktasının üzerindeki sıcaklıklarda gerçekleştirilir. İlaç yüklü lipit eriyiğinin ve sulu emülsiyonlaştırıcı fazının (aynı sıcaklık) bir ön emülsiyonu, yüksek kesmeli karıştırma cihazı (Ultra-Turrax) ile elde edilir. Nihai ürün, sıcak y/s emülsiyonudur ve bu emülsiyonun soğutulması, lipitin kristalleşmesine ve KLN'lerin oluşumuna yol açmaktadır. Lipid fazının düşük viskozitesi nedeniyle daha yüksek işlem sıcaklıklarında daha küçük partikül boyutları elde edilir. Bununla birlikte, yüksek sıcaklık ilacın ve taşıyıcının bozunma hızına yol açar. Homojenizasyon sıcaklığının veya devir sayısının artırılması, genellikle partiküllerin yüksek kinetik enerjisine bağlı olarak partikül büyüklüğünün artmasına neden olur. Genel olarak, 500-1500 bar basınçta 3-5 homojenizasyon döngüsü kullanılır. Sıcak homojenizasyonun üç temel sorunu vardır. Birincisi ilacın sıcaklığa bağlı bozunması, ikincisi ilacın homojenleştirme sırasında sulu faza nüfuz etmesi ve üçüncüsü nanoemülsiyonun kristalizasyon aşamasının karmaşıklığıdır ve birkaç değişikliğe ve / veya aşırı soğutulmuş eriyiklere yol açmaktadır[71,75].

- *Soğuk homojenizasyon*

Sıcak homojenizasyon ile ilişkili çeşitli sorunların üstesinden gelmek için soğuk homojenizasyon geliştirilmiştir. Nanoemülsiyonun kristalleşme aşamasının karmaşık olmasından dolayı lipitin önceden belirlenemeyen polimerik geçişleri, birkaç modifikasyon veya süper soğutulmuş eriyik ile sonuçlanmaktadır. Burada ilaç erimiş lipit içine dahil edilir ve lipit eriyik kuru buz veya sıvı azot kullanılarak hızla soğutulur. Katı madde bir harç değirmeni tarafından öğütülür. Hazırlanan lipit mikropartikülleri daha sonra oda sıcaklığında veya altında bir soğuk emülsiyonlaştırıcı çözeltisi içinde dağıtılır. Homojenizasyon sırasında lipitin katı halini sağlamak için sıcaklık etkili bir şekilde ayarlanmalıdır. Bununla birlikte, sıcak homojenizasyon ile karşılaştırıldığında, daha

büyük parçacık boyutları ve daha geniş bir boyut dağılımı, soğuk homojenleştirme numunelerine has bir özelliktir[73,75].

Şekil 1.11. KLN'lerin üretimi için sıcak ve soğuk homojenizasyon yöntemi[76]



Mikroemülsiyon yöntemi

Mikroemülsiyon, oda sıcaklığında lipit katı ile bir mikroemülsiyon oluşturacak şekilde lipitin erime noktasının üzerindeki bir sıcaklıkta üretilmelidir. Bu mikroemülsiyonlar, bir lipofilik faz, yüzey aktif madde, çoğu durumda bir yardımcı yüzey aktif madde ve sudan oluşan berrak veya hafif mavimsi çözeltilerdir. Önce lipit (yağ asidi veya trigliserit) eritilir; bir yüzey aktif madde, yardımcı yüzey aktif madde ve su karışımı,

lipit fazı ile aynı sıcaklığa ısıtılır ve yumuşak karıştırma altında lipit eriyiğine ilave edilir. Bileşikler doğru bir oranda karıştırıldığında, şeffaf ve termodinamik olarak kararlı mikroemülsiyon sistemi oluşur. Bu mikroemülsiyon daha sonra ince sulu parçacıklar oluşturan lipit fazını çökeltmek için hafif sulu bir karıştırma altında soğuk sulu bir ortamda (2-3 ° C) dağıtılır. Suya bir mikroemülsiyon eklenmesi, ince tanecikler oluşturan lipit fazının çökmesine yol açar. Mikroemülsiyon tekniği ile SLN'nin büyük ölçekli üretimi de mümkündür ve ölçeklendirme sırasında dikkate alınması gereken ana proses parametreleri arasında mikroemülsiyon ve su sıcaklığı, su ortamındaki sıcaklık akışları ve karıştırılmaması gereken termodinamik özellikleri yer almaktadır[72].

Çözücü emülsifikasyon-eyaporasyon veya çözücü difüzyon yöntemi

Bu yöntemde, lipit su ile karışmaz bir organik çözücü içinde çözülür. Daha sonra yüzey aktif madde içeren sulu bir fazda bir emülsiyon oluşmaktadır. Çözücüyü emülsiyondan çıkarmak için düşük basınç altında buharlaştırma kullanılır. Buharlaşma nanopartiküllerin sulu fazda dağılmasına yol açar (sulu fazda lipit çökeltme işlemi kullanılarak). Soğuk homojenizasyondan farklı olarak, bu yöntem herhangi bir termal gerilime girmeyecektir, ancak bu yöntemde kullanılan organik çözücü bir dezavantajdır. Partikül boyutu katı lipit ve yüzey aktif maddeye göre değişebilir[71].

Yüksek hızda homojenizasyon/Ultrasonikasyon yöntemi

Her iki yöntem de sık olarak kullanılmakta ve uygulanması kolay yöntemlerdendir. Genellikle bir arada kullanılan bu yöntemler, belli bir süre boyunca yüksek sıcaklıklarda uygulanmaktadır. Yüksek hızda karıştırma yönteminin dezavantajı, mikrometre boyutuna varabilen geniş partikül büyüklüğü dağılımına sahip ürün vermesidir. Bu da, saklama sırasında partikül büyümesi gibi fiziksel stabilite problemlerine sebep olmaktadır. Bunlara ek olarak, ultrasonikasyon yöntemi kullanılıyorsa, metal kontaminasyonu dikkate alınmalıdır[74].

Süperkritik sıvı kullanma yöntemi

Bu yöntem, KLN'lerin üretimi için son zamanlarda uygulanan yeni bir tekniktir. Bir sıvı, basıncı ve sıcaklığı ilgili kritik değerlerini aştığında süperkritik olarak adlandırılmaktadır. Süperkritik olan sıvının bileşikleri çözme kabiliyeti artmaktadır. Bu teknoloji nanopartikül üretimi için süperkritik çözeltilinin (RESS) hızlı genişlemesi, gaz

doymuş çözeltilerden (PGSS) parçacıklar, aerosol çözücü ekstraksiyon çözücüsü (ASES), emülsiyonların süperkritik sıvı ekstraksiyonu (SFEE) gibi çeşitli işlemlerden oluşur. Bu tekniğin avantajları, çözücülerin kullanımından kaçınmayı, süspansiyonlar yerine kuru toz olarak elde edilen parçacıkların hafif basınç ve sıcaklık koşullarını gerektirmesini içerir. Karbondioksit(CO₂) çözeltilisi, bu yöntem için çözücü olarak iyi bir seçimdir[75].

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan cihazlar

- Biyogüvenlik kabini Class 2
- Buzdolabı (+4 °C ve -20 °C)
- Mikroplate okuyucu
- Inverted mikroskop
- Santrifüj
- Otomatik Pipet
- CO₂ inkübatörü
- Su banyosu
- Sıvı azot tankı (-196°C)
- Flow sitometri
- Ultra-turrax

2.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

- RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium)
- FBS (Fetal Bovine Serum)
- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Tripsin
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000 U/mL penisilin, 10mg/mL streptomisin)
- DMSO (Dimetil sülfoksit)
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid)
- Escin
- Tween 80
- Flask (25 ve 75 cm²'lik)

- Plaka (6 ve 96 kuyucuklu)
- Pipetler (2, 5 ve 10 ml'lik)
- Steril Falkon Tüpler (15 ve 50 ml)
- Pastör pipet
- Enjektör (10, 20 ve 50 ml'lik)
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron)
- Kryotüp

2.2. Metod

2.2.1. Kullanılan besi yerinin hazırlanması

Besi yerinin hazırlanması için, 500 ml sıvı RPMI içine 5 ml Penicilin streptomycine ve 50 ml FBS (Fetal Bovine Serum) konularak karıştırılır. Karıştırılan besi yeri 22 µm'lık filtreden geçirilir. Hazır olan besi yeri +4°C'de saklanır.

2.2.2. Du-145 hücrelerinin çoğaltılması

Deneyde kullanılacak hücrelerin çoğaltılması ve daha sonra tekrar kullanılması için gerekli işlemler yapılır. Bunlar; stok açma, pasaj işlemi, medyum değiştirme işlemi ve hücre stoklamadır.

➤ Stok açma

Azot tankında krotüplerde stoklanmış olan hücreler çoğaltılmak üzere tanktan çıkarılır. Tüpler elde ovuşturularak eritilir. Olası kontaminasyonları önlemek için %70'lik etil alkol ile silinerek steril kabine alınır. Önceden ısıtılmış medyumdan 10 ml alınarak falkon tüpe aktarılır. Tüp içeriği hücrenin kullanıldığı besi yeri içerisine boşaltılır ve ağzı sıkıca kapatılarak 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilir. Santrifüj işlemi bittikten sonra süpernatant atılarak hücrelerin üzerine yeni besi yeri eklenir. Eklenen yeni besi yeri bir pipet yardımıyla pipetaj yapılarak karıştırılır. Pipetajdan sonra tüpten hücreli medyum çekerek flaslara bölüştürülür. Flasklar 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakılır. Olabilecek kontaminasyonları görmek veya pasaj işlemine gerek olup olmadığına karar verebilmek için flasklar günlük olarak inverted mikroskopta incelenir.

➤ Pasaj işlemi

Günlük kontrol edilen hücreler flask içinde %80 veya daha çok yoğunluğa ulaşmış olduğu gözlemlenir ise pasaj işlemi uygulanır. Hücre ile dolu olan flask, inkübatörden

alınarak steril kabin içerisine konur. Flask içerisindeki medyum pipet yardımıyla çekilip atılır. Flask 3 ml PBS ile 1 dakika boyunca yıkanır. Daha sonra PBS uzaklaştırılır. Ardından hücreler üzerine 2 ml tripsin eklenir. Tripsinli flasklar inkübatöre kaldırılıp 3-5 dakika arası bekletilir. Bekleme süresinin tüm deney boyunca aynı olması çok önemlidir. Çünkü hücreler tripsine direnç gösterebilir. Tripsinli flasklar bekleme süresi sonunda inkübatörden alınıp inverted mikroskop altında incelenir. Hücreler kalktıysa, yani yuvarlak görünümüleriyle yüzer halde görünüyorsa flask kabine alınır. Kalkmayan hücreler için flaskın yan taraflarına hafifçe vurulup kalkması sağlanır. Kabine alınan flask içerisine medyum konulup pipetaj işlemi uygulanır. Flasktan alınan hücreli besi yeri steril bir falkon tüpe aktarılıp ağzı sıkıca kapatılır. Tüp 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Santrifüjden alınan falkon tüp %70'lik alkolle silinerek steril kabin içerisine alınır. Tüpün içerisinde hücreler, dipte beyaz hücre toplulukları (pellet) olarak görülür. Üstteki süpernatant kısmı pipetle atılır. Bunun sebebi içerisinde tripsin olmasıdır. Tekrar hücreler üzerine yeni besiyeri eklenir. Ardından pipetaj yardımıyla pellet besiyeri içerisine süspanse edilir. Hücrenin yoğunluğuna göre yeni flasklar içerisine 10 ml besi yeri konarak hazırlanır. Falkon tüp içerisinde süspanse edilen besi yerinden 2 ml kadar flasklara aktarılır. Inverted mikroskop altında yoğunluklarına bakılır. Bir sonraki pasajlamaya kadar hücreler 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilir. Hücreler günlük kontrol edilir.

➤ **Medyum (besiyeri) değiştirme**

Medyum değiştirme işlemi genelde stok açma işleminden 1 gün sonra veya flaskı tam kaplamamış hücreler varsa ve besiyeri hafif renk değiştirmişse yapılır. Medyum değiştirme işlemi için, flasklarda üremiş ve çoğalmış olan hücreler üzerindeki besiyeri çekilerek atılır. Bu hücreler üzerine 10 ml besiyeri eklenerek 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübaskona bırakılır.

➤ **Hücre stoklama**

Flaskın tabanını bir tabaka şeklinde kaplayacak kadar üremiş olan hücreler steril kabine alınarak içerisindeki besi yeri uzaklaştırılır. 1 dakika boyunca 3 ml PBS ile yıkanır. PBS pipet yardımıyla uzaklaştırılır. Hücrelerle dolu olan flaskın içerisine yaklaşık 1 ml kadar tripsin eklenerek 5 dk inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda flask steril kabine alınarak içerisine 5 ml medyum eklenir ve falkon tüpe aktarılır. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj

edilir. Tüpteki tripsinli besiyeri uzaklaştırılır ve pellet üzerine 1.8 ml yeni medyum eklenerek iyice pipetaj yapılır. İyice pipetaj edildikten sonra steril kryo tüpe 1.8 ml'lik içerisinde hücre olan medyum dikkatlice konur. Üzerine 200 µl DMSO yavaş yavaş eklenir. Ağzı sıkıca kapatılan kryo tüp buz dolu bir kap içerisinde dik vaziyette yarım saat bekletilir. Daha sonra -20 °C de 2 saat kadar bekletilir. Süre sonunda donan kryo tüpler -196 °C'deki azot tankına yerleştirilerek yerleri not edilir. Kryo tüpler üzerine hücre adı, stoklama tarihi, stok yapan kişinin adı gibi bilgiler asetat kalem ile yazılır.

2.2.3. Escin yüklü katı lipid nanopartiküllerin hazırlanması

Bu çalışmada kullanılacak olan escin yüklü KLN sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. KLN hazırlanmasında % 3 lipid, % 5 etken madde ve % 1,2 oranında Tween 80 kullanılmıştır. Sıcak homojenizasyon, lipidin erime noktasının üstündeki sıcaklıklarda gerçekleştiği için KLN hazırlanmasında kullanılan lipid, erime derecesinin yaklaşık 5-10°C üzerine ısıtılır[74]. 80°C'de eriyen lipidin içerisine etken madde (escin) ilave edilerek çözdürülür. Daha sonra birkaç damla Tween 80 eklemesi yapılarak Ultra-turrax ile 20500 rpm'de yaklaşık 1 dakika karıştırılır. Böylece elde edilen homojenizasyon ürünü, sulu yüzey etkin madde çözeltisi içinde eritilmiş lipitten oluşan bir y/s emülsiyonudur. Karışım oda sıcaklığında soğumaya bırakılır. Bu soğuma sırasında katılaştıran damlacıklar KLN'yi oluşturmaktadır[76]. Daha sonra 0.2 µm'lik filtrelerden geçirilerek kullanılabildiği kadar buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

2.2.4. MTT kolorimetrik sitotoksisite tayini

MTT ölçümü, *in vitro* koşullarda hücre metabolizmasını, canlılığını ve sitotoksisiteyi ölçmek için kullanılan kantitatif kolorimetrik bir yöntem olup hızlı kolay ve yüksek oranda doğruluğa sahiptir. MTT, sarı renkte olup, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bağlanma sonucunda suda çözünmeyen, koyu mavi renkte kristaller oluşmaktadır. Bu kristaller DMSO ile çözünmektedir. Çalışmada kullanılan Du145 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara, kuyucuk başına 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Plakaya ekilen hücreler asetat kalemiyle isimlendirilip 37°C ve %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra seri dilüsyon yöntemi ile Du145 hücreleri 1,56-100 µM dozları arasında kontrol, escin ve escinnano ile 24 saat inkübe edilmiştir. Kontrol grubu ilaç ve KLN içermeyen gruptur. İnkübasyonun sonunda steril kabine alınan plakaya

her kuyucuğa 20 µl MTT eklenip 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda canlı hücrelere giren MTT koyu mavi renkli formazan ürününe dönüştüğü için renk değişimi gözlenmektedir. Plakadaki her kuyucuğun içindeki ilaçlı besi yeri boşaltılıp her bir kuyucuğa 100 µl DMSO çözeltisi konulmuştur. Burda DMSO çözeltisinin etkisi, kuyucuklardaki formazan kristallerinin çözülmesini sağlamaktır. Daha sonra DMSO'lu plaka, plaka okuyucusunda 540 nm'de absorbans değerleri okutulmuştur. Deney 3 kez tekrarlandıktan sonra uyguladığımız escin ve escin yüklü KLN'Lerin Du145 hücreleri üzerindeki IC₅₀ konsantrasyonları canlılık değerleri kullanılarak Microsoft Office Excel programında hesaplanmıştır.

2.2.5. Konfokal mikroskopi yöntemi

Konfokal mikroskopi yöntemi ile kontrol, escin ve escin yüklü KLN'nin Du145 hücreleri üzerinde sebep olduğu morfolojik değişiklikler incelenmiştir. İncelenecek hücreler kuyu başına 3x10⁵ hücre olacak şekilde, 6 kuyucuklu plakaya kontrol, escin ve escinnano'nun IC₅₀ konsantrasyonu ile 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler, 24 saatin sonunda üzerindeki besi yeri uzaklaştırılıp PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında hücreler akridin oranj ve falloidin boya ile ikili boyanarak oluşan morfolojik değişiklikler konfokal mikroskopta görüntülenmiştir. Yüksek çözünürlükte farklı fokal düzlemlerden alınan işaretlenmiş örnekler, kesit katmanları tekrar üst üste konulup yapılandırılarak Leica SP5II konfokal mikroskobunda elde edilmiştir.

2.2.6. Akış sitometri yöntemi

Akış (Flow) sitometri floresan yoğunluğuna bağlı olarak süspansiyon halindeki hücrelerin büyüklüğüne ve granülaritesine göre tek hücre seviyesinde kantitatif ölçüm yapan bir sistemdir[77]. Akış sitometride kullanılan Anneksin V-FITC, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfotidilserine bağlanabilen bir protein olduğundan, floresan madde ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale gelmektedir. Anneksin V-FITC kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfotidilserine bağlanma oranı akış sitometri ile ölçülebilmektedir[43]. Bu çalışmada Du145 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 5x10⁵ hücre olacak biçimde ekilmiştir. Ekimin ardından 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler kontrol, escin ve KLN yüklü escin'nin IC₅₀ konsantrasyonları uygulanarak 24 saat bekletilmiştir.

Daha sonra hücreler flasktan kaldırılmış ve 2 defa 1200 rpm'de 5'er dakika santrifüj edilmiştir. Her santrifüj işleminde PBS ile hücreler yıkanmış ve son PBS eklenmesinden sonra steril falkon tüp içerisinde süspansiyon edilmiştir. Bu süspansiyondan bir ependorf tüpüne 100 µl aktarılmıştır. Aktarma işleminden sonra üzerine Anneksin V-FITC solüsyonundan 100 µl konularak 20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Ardından akış sitometri cihazında (Muse Cell Analyser, Merk-Millipore) analizi yapılmıştır.

2.2.7. İstatiksel analiz

Microsoft Office Excel programının tahmin fonksiyonu kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır ve elde edilen % canlılık değerlerinin kontrole göre anlamlı olup olmaması Graph Pad Prism 7.0 bilgisayar programı ile yapılmıştır.

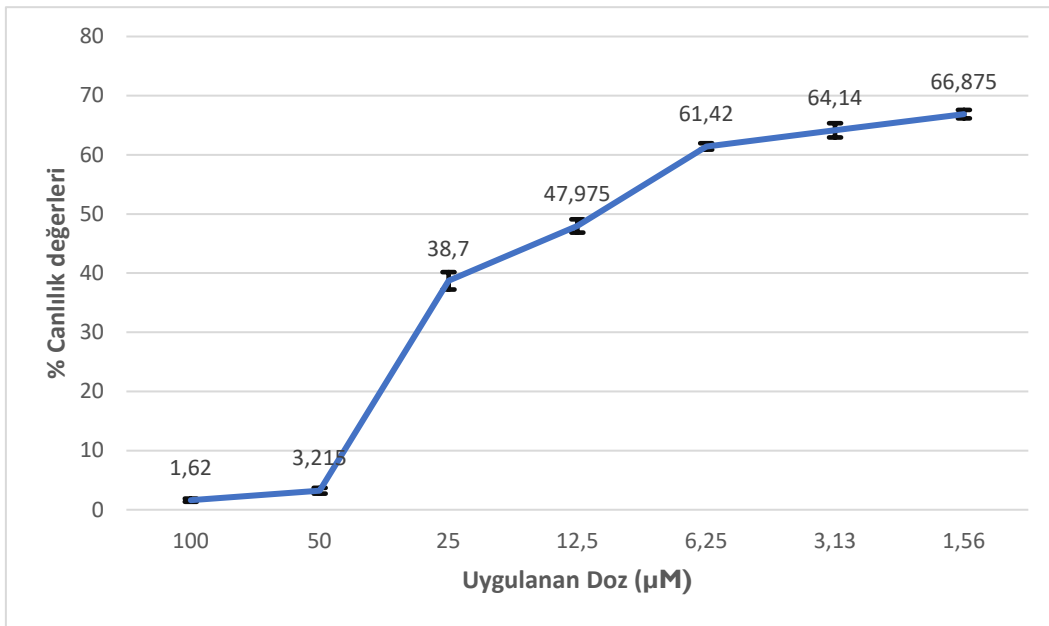
3. BULGULAR

3.1. MTT Kolorimetrik Sitotoksosite Bulguları

Atkestanesi özütü olan escin'in ve KLN yüklü escin formülasyonunun Du145 prostat kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksitesi MTT yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Deney sonucunda elde edilen absorbanlardan kontrole göre yüzde canlılık değerleri hesaplanmıştır. Yüzde canlılık değerleri kullanılarak Excel programında %50'sini öldüren doz yani IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. MTT yöntemiyle Du145 hücrelerine uygulanan 1,56- 100 µM aralığındaki escin konsantrasyonu arttıkça hücrelerin canlılık yüzdelerinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. Deney sonucunda Du145 hücreleri için escin'in 24 saatlik IC₅₀ değeri 11,5 µM olarak hesaplanmıştır. Yine Du145 hücreleri için escin'in KLN formunun 24 saatlik IC₅₀ değeri 6 µM olarak hesaplanmıştır.

3.1.1. Escinin Du-145 hücreleri üzerindeki sitotoksosite bulguları

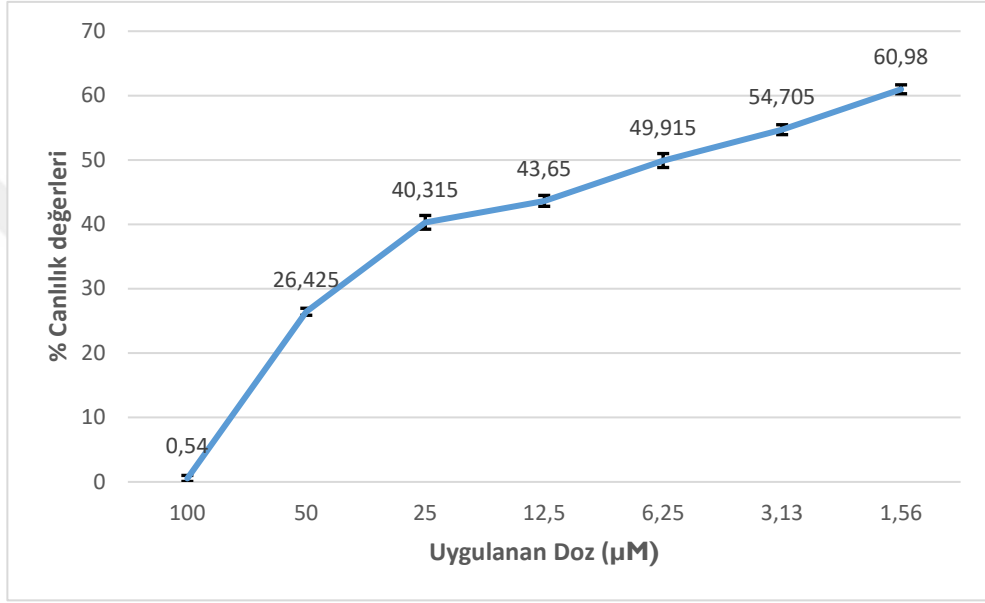
Prostat kanseri hücreleri olan Du145 hücreleri üzerine 24 saat süreyle uygulanan escin'in bu hücreler üzerine sitotoksik etkisi olduğu deney sonucunda görülmüştür. Du145 hücreleri için 24 saatlik IC₅₀ değeri 11,5 µM olarak bulunmuştur. Escin'in Du145 hücreleri üzerine, düşük dozlarından başlayarak sitotoksik etki gösterdiği ve bu etkinin doza bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.1. Escinin Du145 hücrelerine 24 saatlik uygulanması sonucunda elde edilen grafik. (IC₅₀ değeri 11,5 µM olarak hesaplanmıştır.)

3.1.2. Escin yüklü katı lipid nanopartiküllerin Du-145 hücreleri üzerindeki sitotoksosite bulguları

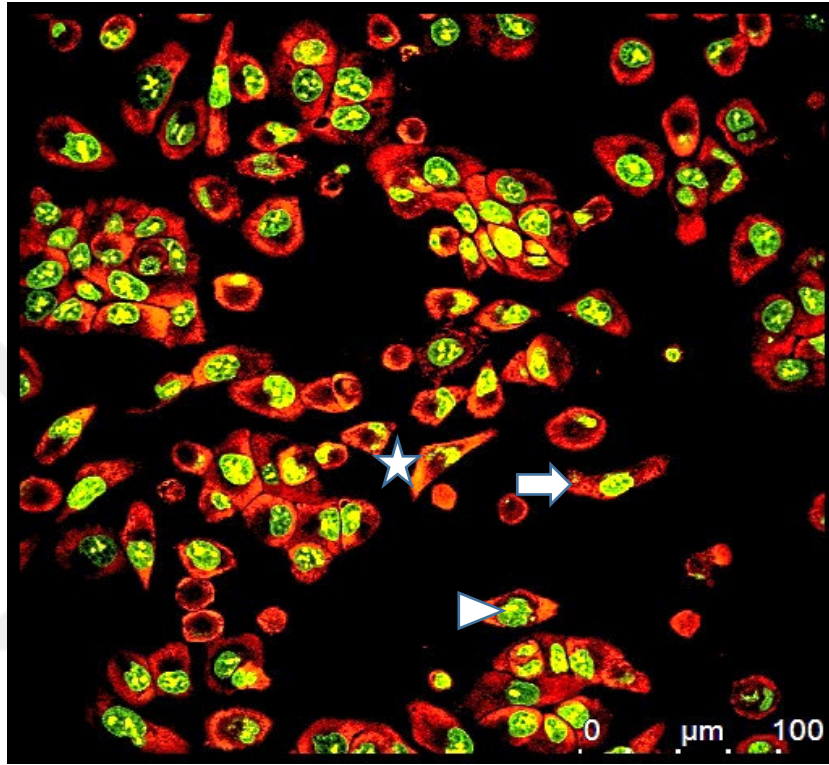
MTT yöntemi kullanılarak Du145 hücreleri üzerindeki sitotoksitesi tespit edilen escin yüklü KLN 1,56-100 μM aralığındaki konsantrasyonlar ile uygulanmıştır. Hücrelerin %50 sini öldüren doz olan IC_{50} değeri 6 μM olarak bulunmuştur. Elde edilen MTT sonuçlarına göre 24 saatlik süre sonucunda Du145 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin doza bağlı olarak düştüğü saptanmıştır.



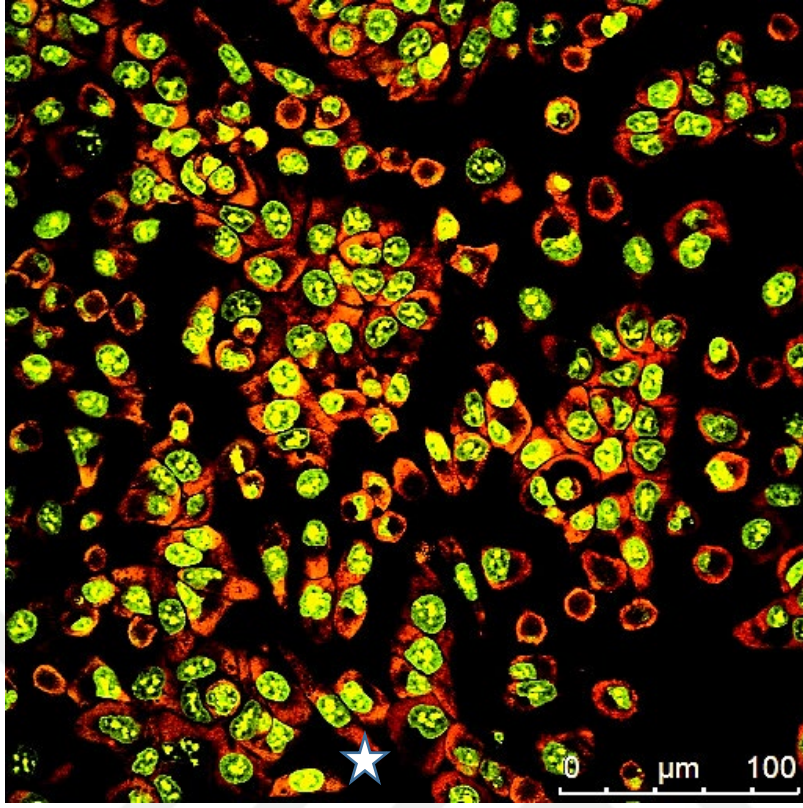
Şekil 3.2. Escin yüklü KLN formülasyonunun Du145 hücreleri üzerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen grafik. (IC_{50} değeri 6 μM olarak hesaplanmıştır.)

3.2. Konfokal Mikroskopi Bulguları

Du145 kontrol hücrelerinin morfolojik yapısı falloidin ve akridin oranj ile yapılan ikili boyama uygulaması sonuçları konfokal mikroskobu altındaki görüntüleri çekilmiştir.



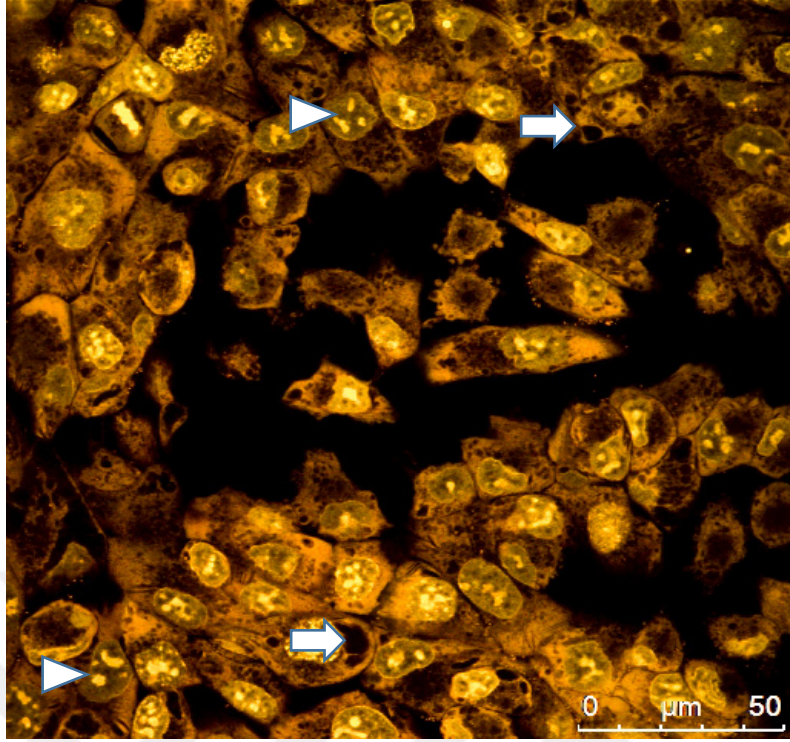
Görsel 3.1. Akridin Oranj ve falloidin ile ikili boyanmış Du145 kontrol hücrelerinin konfokal mikroskopik görüntüsü (1). Yıldız; Du145 hücre yapısı, Ok; hücre iskeleti, Ok başı; Çekirdek yapısı.



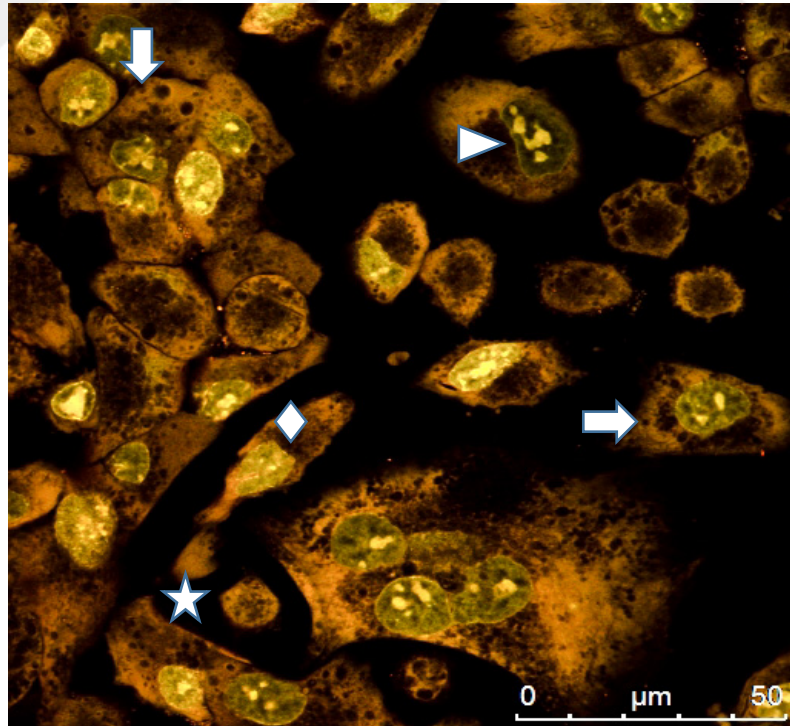
Görsel 3.2. Akridin Oranj ve falloidin ile ikili boyanmış Du145 kontrol hücrelerinin konfokal mikroskopik görüntüsü (2). Yıldız; Du145 hücre yapısı

3.2.1. Escinin Du-145 hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları

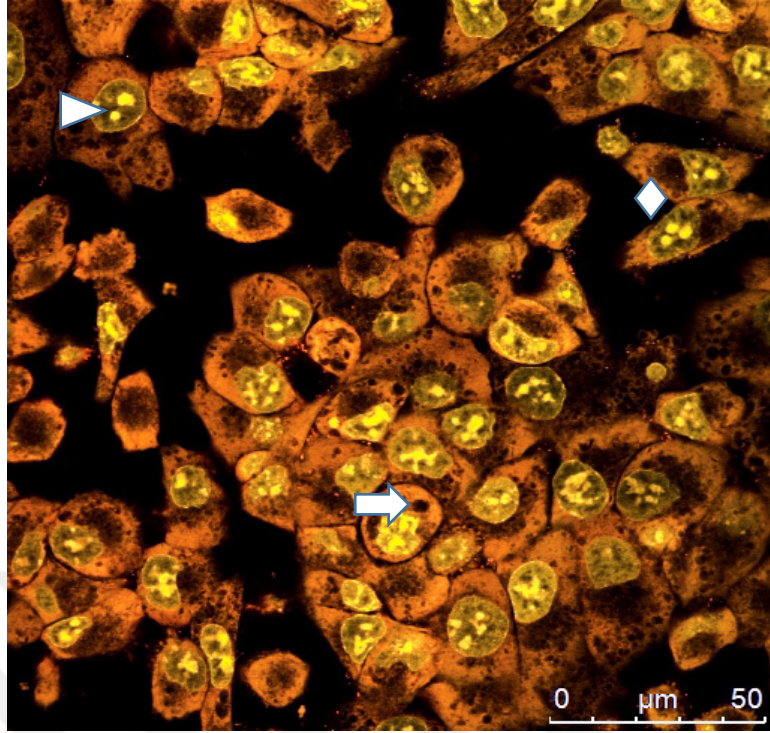
Escinin Du145 hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişiklikler akridin oranj ve falloidin ile gerçekleştirilen ikili boyama uygulaması sonucunda konfokal mikroskopu altında incelenmiştir ve elde edilen mikroskop görüntüleri aşağıda gösterilmektedir.



Görsel 3.3. Escin'in Du145 hücrelerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü (1). Ok; Hücredeki boşluklar, Ok başı; DNA fragmentasyonu.



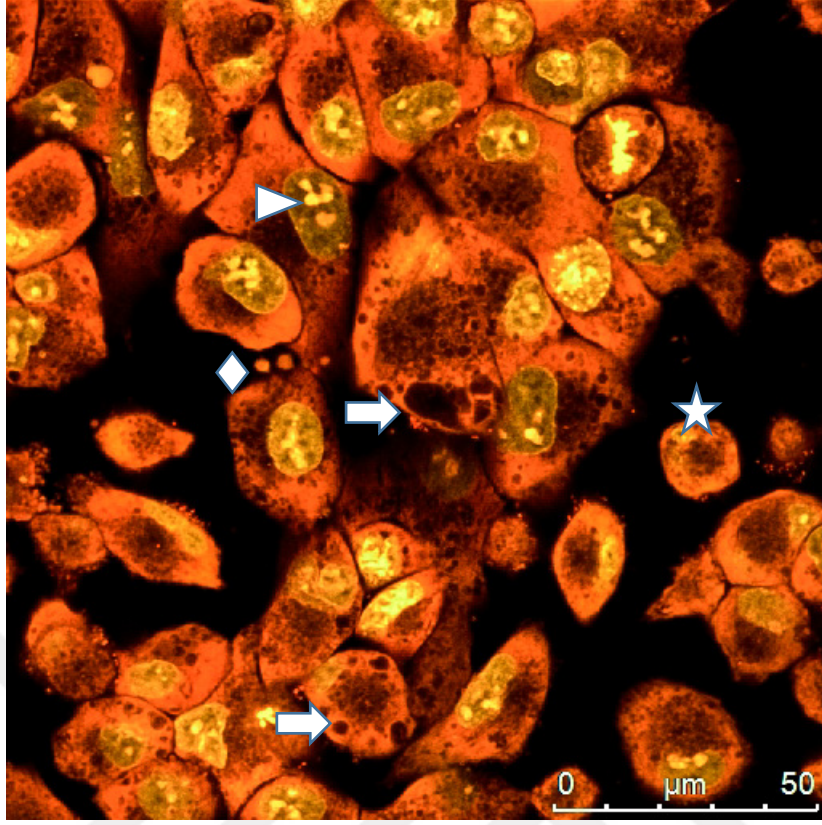
Görsel 3.4. Escin'in Du145 hücrelerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü (2). Ok; Hücredeki boşluklar, Ok başı; DNA fragmentasyonu, Yıldız; yuvarlaklaşmış hücre, Dörtgen; apoptotik hücre.



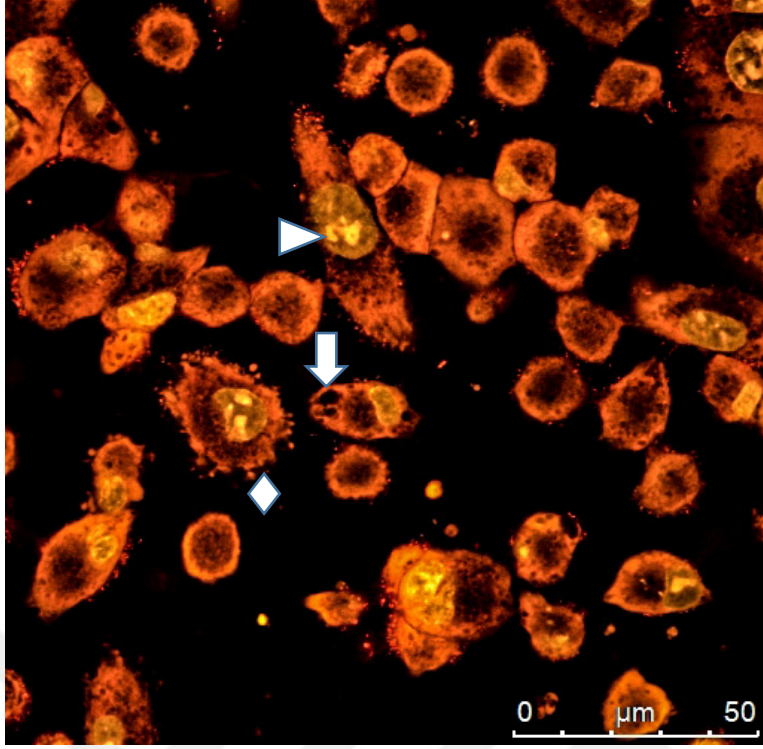
Görsel 3.5. Escin'in Du145 hücrelerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü
(3). Ok; Hücredeki boşluklar, Ok başı; DNA fragmentasyonu, ; Dörtgen; apoptotik hücre.

3.2.2. Escin yüklü katı lipid nanopartiküllerinin Du-145 hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları

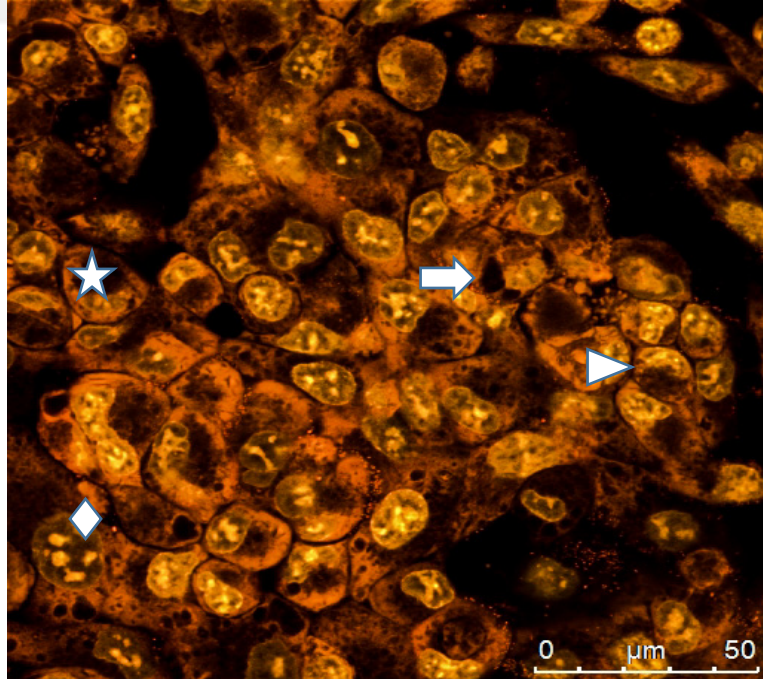
Escin yüklü katı lipid nanopartiküllerinin IC₅₀ konsantrasyonunun 24 saat süre boyunca Du145 hücrelerinin morfolojik yapısı üzerinde sebep olduğu değişiklikler akridin oranj ve falloidin ile gerçekleştirilen ikili boyama uygulaması sonucunda konfokal mikroskop altında incelenmiştir. Elde edilen mikroskop görüntüleri ve morfolojik değişiklikler aşağıda gösterilmektedir.



Görsel 3.6. Escin yüklü katı lipid nanopartiküllerinin Du145 hücreleri üzerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskobik görüntüsü(1). Ok; hücredeki boşluklar, Ok başı; DNA fragmentasyonu, Dörtgen; membran tomurcuklanması, Yıldız; yuvarlaklaşmış hücre.



Görsel 3.7. Escin yüklü katı lipid nanopartiküllerinin Du145 hücreleri üzerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü(2). Ok; hücredeki boşluklar, Ok başı; DNA fragmentasyonu, Dörtgen; membran tomurcuklanması.

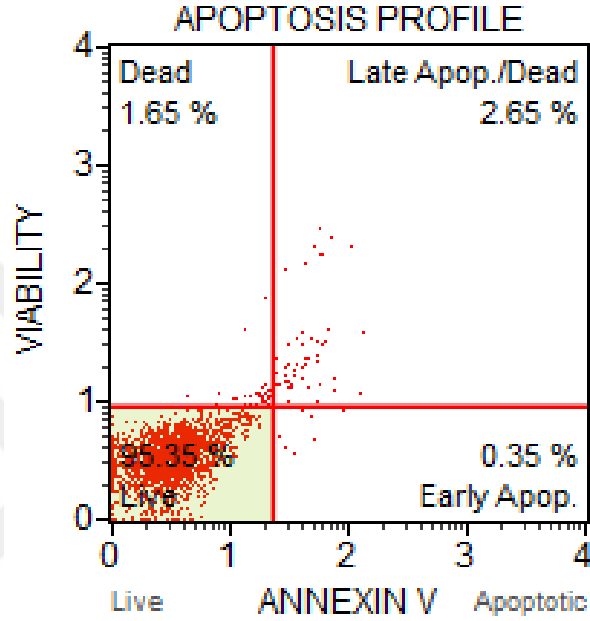


Görsel 3.8. Escin yüklü katı lipid nanopartiküllerinin Du145 hücreleri üzerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü(3). Ok; hücredeki boşluklar, Dörtgen; DNA fragmentasyonu, Ok başı; çekirdeğin at nalı şekline gelmesi, Yıldız; apoptotik hücre.

3.3. Akış Sitometri Bulguları

3.3.1. Anneksin V-FITC uygulamasının akış sitometrisi bulguları

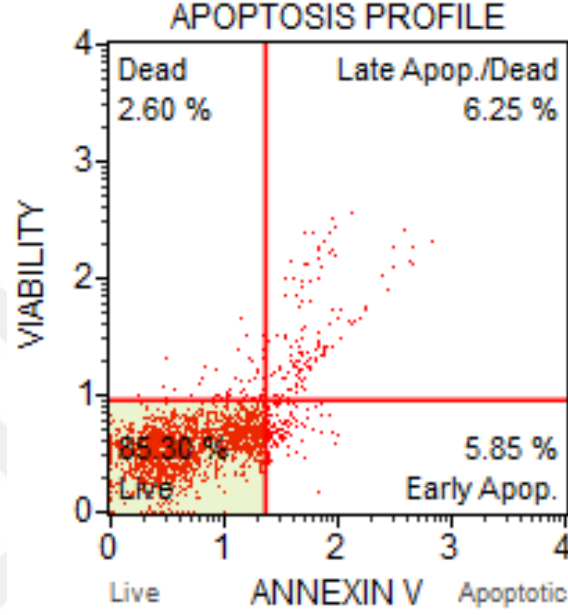
Du145 hücrelerinin apoptotik profillerinin incelenmesi için akış sitometrisinde Anneksin-V uygulaması yapılmıştır. Du145 kontrol hücrelerinde %95.35 canlılık %1.65 oranında ölü hücreler olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.3. Du145 kontrol hücrelerinin apoptotik profili. Ölü hücreler %1.65, Geç apoptotik/ölü hücreler %2.65, Canlı hücreler %95.35, Erken apoptotik hücreler %0.35, Toplam apoptoz %3.00.

3.3.1.1. Escin uygulanan Du-145 hücrelerinin anneksin-V bulguları

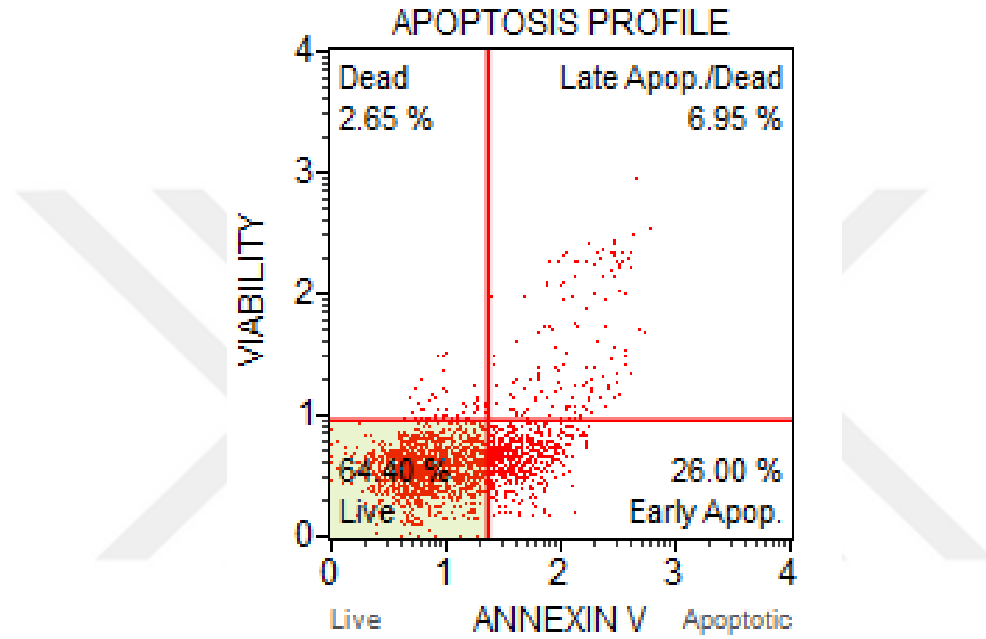
Escin uygulanan Du145 hücrelerinin, apoptotik profillerinin incelenmesi için akış sitometrisinde yapılan Anneksin-V uygulaması sonucunda %85.30 oranında canlılık, %6.25 oranında ölü hücelere rastlanılmıştır.



Şekil 3.4. Escin uygulanan Du145 hücrelerinde Anneksin-V uygulaması sonucu apoptotik profili. Ölü hücreler %2.60, Geç apoptotik/ölu hücreler %6.25, Canlı hücreler %85.30, Erken apoptotik hücreler %5.85, Toplam apoptoz %12.10.

3.3.1.2. Escin yüklü katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı Du-145 hücrelerinin anneksin-V bulguları

Escin yüklü katı lipid nanopartikül formülasyonu uygulanan Du145 hücrelerinin, apoptotik profillerinin incelenmesi için akış sitometrisinde yapılan Anneksin-V uygulaması sonucunda %64.40 oranında canlılık, %26.00 oranında erken apoptotik hücreler gözlemlenmiştir.



Şekil 3.5. Escin yüklü katı lipid nanopartikül formülasyonunun Du145 hücrelerinde Anneksin-V uygulaması sonucu apoptotik profili. Ölü hücreler %2.65, Geç apoptotik/ölmü hücreler %6.95, Canlı hücreler %64.40, Erken apoptotik hücreler %26.00, Toplam apoptoz %32.95.

4. TARTIŞMA SONUÇ

Bilinen tarih boyunca insanlarda ve hayvanlarda sık görülen bir problem olan kanser, bir organizmadaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi, çoğalması ve birikmesi anlamını taşımaktadır[4]. Kanserin günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olmasının sebebi, sık görülmesinin yanında mortalite ve morbiditesinin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Kanserin bilinen pek çok çeşidi bulunmaktadır. Kanser çeşitlerinden biri olan prostat kanseri, erkeklerde en yaygın görülen kanser olmakla birlikte kansere bağlı ölümler arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Buna rağmen, prostat kanserinin erken teşhisi mümkün olduğunda sağ kalım oranları ciddi bir şekilde artmaktadır[23].

Kanserin her zaman bir belirti göstermemesi tanısının konmasında zorluklara yol açsa da oluşumu ve gelişimi hakkında birçok çalışma yapılmıştır[78]. Yapılan bu çalışmalarda kemoterapotik ilaçlarda kullanılmıştır. Bu ilaçlardan biri olan ve aynı zamanda çalışmamızda kullanılan ilaç olan escin (aescin) ile ilgili birçok çalışma vardır. Atkestanesi tohumundan üretilen escinin iki formundan biri ve ana aktif bileşeni olan β -escin yüksek sıcaklıklarda α -escine dönüşebilmektedir[24-26]. β -escin ile yapılan çalışmalarda insan oral mukozal hücre dizisi (KB hücreleri), fare karaciğer kanseri (H22) ve sarkom (S180) hücre dizileri gibi tümör dizilerinin büyümesini inhibe ettiğini göstermişlerdir[33]. Ayrıca β -escinin iyonların kanallarına daha iyi girdiğini ve venöz gerginliğini azalttığı ile ilgili çalışma bulunmaktadır. Diğer yapılan çalışmalarda β -escinin insan kolon kanseri hücrelerinin büyümesinin durdurulmasında ve pankreas kanserinde kanserli hücre hatlarında ciddi oranda azalmalar gösterdiğini tespit etmişlerdir[34]. Başka bir çalışmada ise osteosarkom üzerine yapılmıştır. Bu çalışmada osteosarkom hücrelerinde apoptozun indüklendiği ve escinin bu hücreler üzerinde antiproliferasyon etkisine sahip olduğunu tespit etmişlerdir[35]. Bu çalışmalar ışığında escinin potansiyel bir kemopreventif bir ajan ve kanser hücrelerinin büyümesinin güçlü bir inhibitörü olduğu anlaşılmaktadır.

Kanser teşhisinde kullanılan mevcut yöntemler her zaman yeterli gelmemektedir. Yapılan çalışmalarda, kanser ile ilgili geleneksel teşhis-tedavi yöntemlerinin yetersizlikleri ve yan etkileri görülmektedir. Mevcut yöntemlerde karşılaşılan çeşitli problemler bu yöntemlerin verimliliğini azaltmaktadır. Bu problemler, spektrum aralığının sınırlı olması, hedef hücrelerinin tam olarak odaklanamaması, kullanılan

kemoterapotik ilaçların hedef hücrelere yeterli miktarda nüfus edememesidir. Bu sorunlar son yıllarda yapılan nanoteknoloji alanındaki gelişmeler sayesinde büyük ölçüde ortadan kalkmıştır. Nanoteknoloji yardımıyla yapılan in vivo ve in vitro çalışmalardaki kanser hücreleri, erken dönemlerinde teşhis edilebilmektedir. Nanopartiküller veya nanoyapılar tek bir kanser hücresine bile girebilmesi erken kanser teşhislerini mümkün kılmıştır. Nanoteknolojide kullanılan nanopartiküller, biyolojik yapılar ile aynı boyutta olduğundan kan dolaşımı ile taşınabilmektedir. Günümüzde kullanılan ve genellikle tüm dokulara homojen olarak dağılan ilaçlar yerine nanoteknoloji sayesinde üretilen nanopartiküllerin olduğu ilaçların kullanılması, ilacın doğrudan etki etmesi istenilen bölgeye veya dokuya gönderilmesini sağlamaktadır.

Çalışmamızda yeni sentezlediğimiz escin yüklü katı lipid nanopartiküllerin (KLN) ve escinin sitotoksik, antikanser ve antiproliferatif etkilerinin olup olmadığı Du145 prostat kanseri hücreleri üzerinde araştırılmıştır. Escinin ve escin yüklü KLN formülasyonunun 1,56-100 μM dozları aralığında uygulanması sonucu Du145 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Escinin 24 saatlik IC_{50} konsantrasyonu 11,5 μM ve escin yüklü KLN formülasyonunun 24 saatlik IC_{50} konsantrasyonu 6 μM olarak bulunmuştur. Escinin Du145 hücreleri üzerine hücrelerin yarısını öldüren dozun 24 saatlik uygulanmasının ardından görülmektedir ki escin bu hücreler üzerinde düşük dozlardan başlayarak sitotoksik etki göstermiş ve bu etki doza bağlı olarak artmıştır. Bu durumun escinin Du145 hücreleri üzerinde kanserli hücre büyümesini durdurucu etki göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yeni sentezlenen escin yüklü nanopartikül formülasyonunda da aynı durum söz konusu olmuştur. Escin yüklü KLN formülasyonu ve escin karşılaştırıldığında 24 saatlik hücrelerin yarısını öldüren doz neredeyse 2 kat düşmüştür. Bu durum nanopartikül formülasyonunun küçük boyutları sayesinde hücre içine daha çok etken madde sokmayı sağlayabilecek kapasitede olduğunun göstergesi olarak yorumlanmıştır. Yaptığımız çalışmamızda incelediğimiz bir başka özellik ise escin ve escin yüklü KLN formülasyonlarının Du145 hücreleri üzerinde apoptoz indüklenme özelliklerini tespit etmektir. Bu özelliklerin belirlenmesi amacıyla Du145 hücrelerinin morfolojik yapıları konfokal mikroskobunda incelenmiştir. Ayrıca akış sitometrisinde Annexin-V yöntemi uygulanarak Du145 hücrelerinin apoptotik profillerine bakılmıştır. Yapılan konfokal mikroskopi bulgularında escin ve escin yüklü KLN formülasyonları Du145 hücreleri üzerinde DNA fragmentasyonu, hücre içi boşluklar ve membran tomurcuklanması şeklinde değişiklikler meydana getirerek

hücreleri apoptoza yönlendirmektedir. Escin ve escin yüklü KLN formulasyonlarının Du145 hücreleri üzerine yapılan akış sitometri Anneksin-V uygulaması bulgularında, Du145 hücrelerinin kontrol grubu olarak seçilen grubunda %95,25 canlılık %1,65 ölü hücreler, %2,65 geç apoptotik hücreler ile %0,35 erken apoptotik hücrelere rastlanılmıştır. Escin uygulanan Du145 hücrelerinin Anneksin-V uygulaması sonucu, %85,30 canlılık, %2,60 ölü hücreler, %6,25 geç apoptotik hücreler ve %5,85 erken apoptotik hücreler olduğu görülmüştür. Escin yüklü KLN formulasyonunun Anneksin-V uygulaması sonucuna bakıldığında ise %64,40 canlılık, %2,65 ölü hücreler, %6,95 geç apoptotik hücreler ve %26,00 erken apoptotik hücreler olarak hesaplanmıştır. Akış sitometrisinde uyguladığımız Anneksin-V bulgularının hepsine bakacak olursak kontrol grubunda görülen toplam %3'lük apoptoz miktarı escin uygulanan hücrelerde %12,10 ve escin yüklü KLN formulasyonu uygulanan hücrelerde %32,95 oranında arttığı gözlemlenmektedir.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda atkestanesi özütünden elde edilen escin ve escin yüklü KLN formulasyonlarının Du145 prostat kanseri hücreleri üzerinde etkili bir antikanser ve antiproliferatif etki yarattığı ve ayrıca hücre ölüm mekanizması olarak apoptozu tetiklediği bulgularımızca gösterilmiştir. Bu çalışma sırasında antiproliferatif etkisi belirlenmiş olan escin ve escin yüklü KLN formulasyonlarının kanser tedavileri için kullanılabilir bir ajan olarak görev yapabilmesi için ileri araştırmalara ihtiyaç duyulduğunu önermekteyiz. Yapılan araştırmamız neticesinde, escin yüklü KLN formulasyonunun escine kıyasla hücre içine daha iyi nüfus ettiği ve kontrollü ilaç salınımı sebebiyle daha etkin bir apoptotik indüklenme yolunu kullanarak hücreleri öldürdüğünü görmekteyiz. Çalışmamızın bundan sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı kanaatinde olarak ileri in vitro ve in vivo analizler sonucunda escin ve escin yüklü KLN formulasyonlarının antikanser ilaç olarak kanser tedavisi uygulamaları için etkili bir şekilde kullanılacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKÇA

- [1] Kutluk, T. ve Kars, A. (1992). *Kanser konusunda genel bilgiler*. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı
- [2] Özenoğlu, S., Aydoğdu, G., Dinçsoy, A.B., Taghidizaj, A.A., Derici, K., Yılmaz, E., Aras, S. ve Cansaran Duman, D. (2013). Liken sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. *Türk hijyen ve deneysel biyoloji dergisi*, 70(4), 216.
- [3] [Http://www.kanservakfi.com/kanser-turleri-96.html](http://www.kanservakfi.com/kanser-turleri-96.html) (Erişim tarihi: 18.11.2019)
- [4] Baykara, O. (2016). Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Balıkesir sağlık bilimleri dergisi*, 5(3), 154.
- [5] [Https://neolife.com.tr/kanser-nedir/](https://neolife.com.tr/kanser-nedir/) (Erişim tarihi: 19.11.2019)
- [6] [Https://bursaobm.ogm.gov.tr/Lists/Haberler/Attachments/203/Kanser%20ve%20Erken%20Te%C5%9Fhis%20Dr.%20Ay%C5%9Fe%20Akan.pdf](https://bursaobm.ogm.gov.tr/Lists/Haberler/Attachments/203/Kanser%20ve%20Erken%20Te%C5%9Fhis%20Dr.%20Ay%C5%9Fe%20Akan.pdf) (Erişim tarihi: 19.11.2019)
- [7] Yokuş, B. ve Ülker Çakır, D. (2012). Kanser biyokimyası. *Dicle üniversitesi veterinerlik fakültesi dergisi*, 1(2), 7-18.
- [8] Pazarbaşı, A. ve Kasap, M. (2003). Kanser genetiği. *Dergipak arşiv*, 12, 328
- [9] Onat, T., Emerk, K. ve Sözmen, E. Y. (2002). *İnsan biyokimyası*. Ankara: Palme yayıncılık.
- [10] Aliustaoğlu, M. (Tarihsiz). Temel kanser fizyopatolojisi. *Klinik gelişim*, 46-49.
- [11] Üroonkoloji Derneği. (1999). *Prostat kanseri*. İstanbul.
- [12] Üroonkoloji Derneği. (1999). *İyi huylu prostat büyümesi*. İstanbul
- [13] Şendoğan, F., Turan, T., Güzel, R., Efiloğlu, Ö., Danacıoğlu, Y.O., Atış, R.G., Çaşkurlu, T., Yıldırım, A. (2019). Türkiye'deki ürologların benign prostat hiperlazisi tedavisindeki güncel yaklaşımları. *Yeni üroloji dergisi*. 14(2), 105-113.

- [14] Kosova, F., Arı, Z. (2011). Prostat kanseri ve apoptozis ilişkisi. *Klinik ve deneysel araştırmalar dergisi*. 2(1), 124-131.
- [15] Ersev, D., Ersev, A. (2009). Benign prostat hiperlazisi histopatolojisinde prostatit bir sonuç mu yoksa bir eşlikçi mi?. *Üroonkoloji bülteni*, (2).
- [16] [Http://uroonkoloji.org/wp-content/uploads/2015/08/prostat-kanseribilgilendirme.pdf](http://uroonkoloji.org/wp-content/uploads/2015/08/prostat-kanseribilgilendirme.pdf) (Erişim tarihi: 20.11.2019)
- [17] Bodakçı, M.N., Bozkurt, Y., Atar, M., Hatipoğlu, N.M., Penbegül, N., Söylemez, H., Sancaktutar, A.A., Yıldırım, K. (2012). Düşük prostat spesifik antijen değeri olan hastalara yapılan transrektal prostat biyopsi sonuçları. *Dicle tıp dergisi*, 39(2), 238-241.
- [18] Kaya, M.C., Bez, Y., Demir, A., Bulut, M., Topçuoğlu, V., Kuşçu, M.K., Türkeri, N.L. (2013). Prostat kanseri hastalarında hastalık evrelerine göre anksiyete, depresyon, cinsel işlev bozukluğu ve yaşam kalitesi. *Journal of mood disorders*, 3(1), 23-7.
- [19] Altunkol, A. (2015). *Prostatın cerrahi hastalıkları*. Ankara: Derman Tıbbi Yayıncılık.
- [20] Konaç, E., Sözen, S. (2014). Prostat kanserinin tanı ve tedavisinde moleküler biyolojinin kullanım alanları. *Üroonkoloji bülteni*, 13, 228-235.
- [21] Sağlık Bakanlığı Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğu. (2017). *Prostat kanseri klinik protokolü*. Ankara.
- [22] [Https://www.muratbinbay.com/prostat-kanseri-evrelemesihakkinda?gclid=Cj0KCQiAq97uBRCwARIsADTziyY_AOlzU6l132oKthYiTWf08LtT49jHw7EUKEEzaIOGB_xKPaNyd4QaAvTpEALw_wcB](https://www.muratbinbay.com/prostat-kanseri-evrelemesihakkinda?gclid=Cj0KCQiAq97uBRCwARIsADTziyY_AOlzU6l132oKthYiTWf08LtT49jHw7EUKEEzaIOGB_xKPaNyd4QaAvTpEALw_wcB) (Erişim tarihi: 22.11.2019)
- [23] Güneş, S., Bağcı, H. ve Sarıkaya, Ş. (2003). Prostat kanseri genetiği. *O.M.Ü. tıp dergisi*, 20(3), 152-158.
- [24] [Https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Aescin&gettingStartedReturn=true](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Aescin&gettingStartedReturn=true) (Erişim tarihi: 12.02.2020)

- [25] Li, Q., Ouyang, H., Wang, P. and Zeng, W. (2012). The antinociceptive effect of intrathecal escin in the rat formalin test. *European journal of pharmacology* 674, 234-238.
- [26] Kobryn, J., Zieba, T., Sowa, S.K. and Musial, W. (2020). Influence of acetylated annealed starch on the release of β -escin from the anionic and non-ionic hydrophilic gels. *MDPI pharmaceutics*, 12,84.
- [27] Cingöz, A., Çalış, A., Güven, B., Güven, E., Çelik, K. ve Akpınar, Ö. (2016). At Kestanesinden Nişasta Üretimi ve Özelliklerinin Tespiti, Türkiye 12. Gıda Kongresinde sunulan bildiri. (Erişim tarihi: 12.02.2020).
- [28] Sirtori, C.R. (2001). Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacological research*,44(3).
- [29] Erbing, H. and Winkler, W. (1966). Aescin Recovery. U. S. Patent Office, No: 3,238,190.
- [30] Küçük Kurt, İ., İnce, S., Keleş, H., Küpeli Akkol, E., Avcı, G., Yeşilada, E. Ve Bacak, E. (2010). Beneficial effects of Aesculus hippocastanum L. Seed extract on the body's own antioxidant defense system on subacute administration. *Journal of ethnopharmacology* 129, 18-22.
- [31] Patlolla, J.M.R., Raju, J., Swamy, M.V. and Rao, C.V. (2006). β -escin inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats and regulates the cell cycle growth by inducing p21^{waf1/cip1} in colon cancer cells. *Mol cancer ther*, 5(6).
- [32] Tutton, P.J.M. and Barkla, D.H. (1980). Influence of prostaglandin analogues on epithelial cell proliferation and xenograft growth. *Br. J. Cancer*, 41,47.
- [33] Patlolla, J.M.R. and Rao, C.V. (2015) Anti-inflammatory and anti-cancer properties of β -escin, a triterpene saponin. *Curr Pharmacol Rep*, 1, 170-178.
- [34] Rimmon, A., Vexler, A., Berkovich, I., Earon, G., Ron, I. and Lev-Ari, S. (2013). Escin chemosensitizes human pancreatic cancer cells and inhibits the nuclear faktör-kappaB signaling pathway. *Hindawi publishing Corporation biochemistry research international vol 2013*, 9.

- [35] Zhu, J., Yu, W., Liu, B., Wang, Y., Shao, J., Wang, J., Xia, K., Liang, C., Fang, W., Zhou, C. and Tao, H. (2017). Escin induces caspase-dependent apoptosis and autophagy through the ROS/p38 MAPK signalling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo. *Cell death and disease*,8.
- [36] Bahadır Erdoğan, B. ve Kunt Uzaslan, E. (2003). Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. *Akciğer arşivi*, 4, 165-174.
- [37] Tomatır, A.G. (2003). Apoptoz: programlı hücre ölümü. *T klin tıp bilimleri*, 23, 499-508.
- [38] Tosun, M., Kalkan, S. Ve Cüce, H. (2002). Apoptozisin morfolojik bulgularının klasik histolojik boyama metodu ile gösterimi. *T klin tıp bilimleri*, 22, 258-261.
- [39] Bildik, A. ve Bayar, İ. (2018). Kanserde apoptotik yolların inhibisyonu. *Türkiye klinikleri j vet sci.*, 9 (2), 42-51.
- [40] Evren Abbasoğlu, Ö. ve Hoşal, B.M. (2001). Apoptozis: göz hastalıklarındaki yeri. *T klin oftalmoloji*, 10, 115-120.
- [41] Coşkun, G. ve Özgür, H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Dergipak arşiv*, 20, 145.
- [42] Yılmaz, İ. (2005). *Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi; ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi*. Uzmanlık tezi. İstanbul: Sağlık Bakanlığı, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
- [43] Güleş, Ö., Eren, Ü. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner fakültesi dergisi*. (2), 73-78.
- [44] Öniz, H. (2004). Apoptoz: Ölmeye yatmak. *SSK tepecik eğitim hastanesi dergisi*. 14(1), 1-20.
- [45] Solakoğlu, Z. Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. *Klinik gelişim içinde* (s. 20-25). İstanbul: İstanbul Tabip Odası.
- [46] Kartlaşmış, K., Kökbaş, U. ve Kayrın, L. (2016). Apoptozis biyokimyası. *Arşiv kaynak tarama dergisi*, 25 (1), 52-69.

- [47] Tuncer, S. ve Demirci, M. (2011). Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Dergisi*, 21(2), 141-149.
- [48] https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/67480/mod_resource/content/0/Sitotoksiste.pdf (Erişim tarihi: 16.02.2020)
- [49] Tokur, O. ve Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksiste testleri. *Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.
- [50] Yıldırım Biçer, A.Z. (2011). Seromer esaslı iki farklı indirekt kompozit materyalin sitotoksik etkilerinin *in vitro* değerlendirilmesi. *Gazi Üniversitesi diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 28(2), 69-74.
- [51] Meerloo, J. V., Kaspers, G. and Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, Second Edition*, vol:731.
- [52] Vizyon 2023 Projesi Nanoteknoloji Strateji Grubu. (2004). *Nanobilim ve nanoteknoloji stratejileri*, Tubitak. Ankara.
- [53] Sagun Göküz, B. ve Akaygün, S. (Tarihsiz). Üniversiteden liseye uzanan köprü: bir nanobilim atölye çalışması. *Boğaziçi üniversitesi eğitim dergisi*, 31(2).
- [54] Ateş, H. ve Bahçeci, E. (2015). Nano malzemeler için üretim yöntemleri. *Gazi üniversitesi fen bilimleri dergisi*, 3(2), 483-499.
- [55] Turgut, O., Keskin, H.L. ve Avşar, A.F. (2011). Nanoteknoloji nedir?. *Türk tıp dergisi*, 5(1).
- [56] Kalaycıoğlu, G.D. (2017). *Katı lipit nanopartiküller kullanılarak kolloidal mikrokapsül üretimi*. Doktora tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı.
- [57] Dikensoy, Ö. (2010). Nanopartiküller ve plevra. *TTD plevra bülteni*, 4(1).
- [58] Gürmen, S. ve Ebin, B. (Tarihsiz). Nanopartiküller ve üretim yöntemleri-1. *TMMOB Metalurji Mühendisler Odası*, 31-38.
- [59] Murthy, S.K. (2007). Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. *International journal of nanomedicine*, 2(2),129-141.

- [60] Kavaz, D. (2011). Nanopartiküller. *Nanoteknoloji ve nanotıp bilim dergisi*, Mayıs sayısı. http://www.nanott.hacettepe.edu.tr/nanobulten/13/nanobulten13_lr.pdf (Erişim tarihi: 16.02.2020)
- [61] Kumar, B.P. and Karimulla, Sk. (2012). Solid lipid nanoparticles-a brief review. *International journal of advanced pharmaceuticals*, 2(1), 35-55.
- [62] Sivadasan, D., Madavan, B., Penmatsa, S.D. and Bathini, S.T. (2013). Formulation and characterization of solid lipid nanoparticles of rifampicin. *Erciyes Med J*, 35(1), 1-5.
- [63] <https://prezi.com/p/3flyelcg0kbq/kln-kati-lipit-nanopartikuller/> (Erişim tarihi: 23.02.2020)
- [64] <http://kimyakongreleri.org/K2014/4kozmetik-s016.pdf> (Erişim tarihi: 23.02.2020)
- [65] Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E. and Harding, I. (2015). Composition and structure. *SpringerBriefs in pharmaceutical science & drug development*, 11-22.
- [66] Olbrich, C., Kayser, O. and Müller, R.H. (2002). Lipase degradation of dynasan 114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN)-effect of surfactans, storage time and crtstallinity. *International journal of pharmaceuticals*, 119-128.
- [67] Büyükköroğlu, G. (2005). *Farmasötik biyoteknoloji'de gen tedavisi amaçlı plazmit DNA taşıyıcı katyonik katı-lipit nano veya mikropartiküllerin hazırlanması çalışmaları*. Doktora tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [68] Lin, C.H., Chen, C.H., Lin, Z.C. and Fang, J.Y. (2017). Recent advances in oral delivery of drugs and bioactive natural products using solid lipid nanoparticles as the carriers. *Journal of food and drug analysis*, 25, 219-234.
- [69] Patel, D., Kesharwani, R. and Gupta, S. (2013). Development & screening approach for lipid nanoparticle: a review. *International journal of innovations in pharmaceutical sciences*, 2(5), 27-32.
- [70] Sumera., Anwar, A., Ovais, M., Khan, A. and Raza, A. (2017). Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles: a novel drug delivery system. *IET Nanobiotechnology*.

- [71] Naseri, N., Valizadeh, H. and Zakeri-Milani, P. (2015). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 5(3), 305-313.
- [72] Pardeshi, C., Rajput, P., Belgamwar, V., Tekade, A., Patil, G., Chaudhary, K. and Sonje, A. (2012). Solid lipid based nanocarriers: an overview. *Acta pharmaceutica*, 62, 433-472.
- [73] Ekambaram, P., Abdul Hasan Sathali, A. and Priyanka, K. (2012). Solid lipid nanoparticles: a review, *Scientific reviews & chemical communications*, 2(1), 80-102.
- [74] Numanoğlu, U. ve Tarımcı, N. (2006). Katı lipid nanopartiküllerin (SLNTM) özellikleri, farmasötik ve kozmetik alandaki uygulamaları. *Ankara eczacılık fakültesi dergisi*, 35(3), 211-235.
- [75] Garud, A., Singh, D. and Garud, N. (2012). Solid lipid nanoparticles (SLN): method, characterization and applications. *International current pharmaceutical journal*, 1(11), 384-393.
- [76] Demirel, M. ve Yazan, Y. (2000). Katı lipid nanopartiküller (SLN). *FABAD J. Pharma. Sci.*, 25, 167-179.
- [77] Orlinov Kanev, M. ve Gökalg Muranlı F.D. (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. *SAÜ fen bilimleri dergisi*, 20(1), 33-38.
- [78] Oylar, Ö. ve Tekin, İ. (2011). Kanserin teşhis ve tedavisinde nanoteknolojinin önemi. *Uludağ üniversitesi mühendislik-mimarlık fakültesi dergisi*, 16(1), 147-154.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ece KAYA

Yabancı Dil :İngilizce

Doğum Yeri ve Yılı: Eskişehir/ 1991

E-Posta : ecekaya678@gmail.com

Eğitimi:

- Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2017)
- Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı (2018)

Poster Bildirileri

- 2018, Poster Bildiri, Effect of A Escin Nano-formulation on Human Lung Adenocarcinoma Cells, EACR 25.
- 2018, Poster Bildiri, Examination the effects of Escin nano-formulation on The ultrastructure of Lung cancer cell Lines, Turkish american scientists and scholars association.
- 2017, Poster bildiri, Impact of silymarin nano formulation on human lung adenocarcinoma cells, 3rd World Congress and expo on Oncology and Radiology.
- 2017, Poster bildiri, Examination the effects of a novel silymarin-loaded nano formulation on the ultrastructure of A549 cells, 3rd World Congress and Expo on Oncology and Radiology.
- 2017, Poster Bildiri, Silymarin-loaded solid lipid nanoparticles-derived 3D ultrastructural changes on human breast cancer cells, 3rd World Congress and Expo on Oncology and Radiology.

- 2017, Poster Bildiri, Investigation of effects of commercial plant based silymarin on human lung adenocarcinoma cells, 15 International Congress of Histochemistry and Cytochemistry.
- 2017, Poster Bildiri, Effects of a newly synthesized nano-silymarin compound on human breast cancer cell line, 15 International Congress of Histochemistry and Cytochemistry.

Sertifikaları:

- 15 Mart 2015 (Educon)** : İyi Hijyen Uygulamaları
: ISO 17025: 2005 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvar Akreditasyon Standartı
: İyi Laboratuvar Uygulamaları
: İyi Üretim Uygulamaları
- 08 Mart 2015 (Educon)** : İkna Teknikleri
: İş Hayatının Beklentileri ve İş Avcılığı
- 03-04 Mayıs 2018** : Leica EM Sample Preparation of Biyological Materials
(Leica Microsystems)
- 13 Haziran 2019 (ESTÜ)** : Lipid Araştırmalarında Kanser ve Lipidomiks Çalıştayı