

T.C  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METFORMİN YÜKLÜ PLGA-PEG (POLİ-D,L-LAKTİK-KO-  
GLİKOLİK ASİT-POLİ ETİLEN GLİKOLİK ASİT)  
NANOPARTİKÜLERİNİN SENTEZLENMESİ VE  
ANTİKANSER ETKİLERİNİN FOLİKÜLER TİROİD KANSERİ  
(FTC-133) HÜCRE HATTI ÜZERİNDE *IN VİTRO*  
İNCELENMESİ

EZGİ İTİL

ORCID: 0000-0003-4122-6965

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR  
AĞUSTOS 2023

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc -2019970176

T.C  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METFORMİN YÜKLÜ PLGA-PEG (POLİ-D,L-LAKTİK-KO-  
GLİKOLİK ASİT-POLİ ETİLEN GLİKOLİK ASİT)  
NANOPARTİKÜLERİNİN SENTEZLENMESİ VE  
ANTİKANSER ETKİLERİNİN FOLİKÜLER TİROİD KANSERİ  
(FTC-133) HÜCRE HATTI ÜZERİNDE *IN VİTRO*  
İNCELENMESİ

EZGİ İTİL

ORCID: 0000-0003-4122-6965

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülgün OKTAY

ORCID: 0000-0002-0481-6029

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü  
tarafından TYL-2022-2619 numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR  
AĞUSTOS 2023

**T.C**  
**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**ETİK BEYANI**

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum 'METFORMİN YÜKLÜPLGA-PEG (POLİ-D,L-LAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT-POLİ ETİLEN GLİKOLİK ASİT) NANOPARTİKÜLERİNİN SENTEZLENMESİ VE ANTİKANSER ETKİLERİNİN FOLİKÜLER TİROİD KANSERİ (FTC-133) HÜCRE HATTI ÜZERİNDE *IN VİTRO* İNCELENMESİ' başlıklı Yüksek Lisans Tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri, akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm kayıplılarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza:

Ad-Soyad: Ezgi İtil

Tarih: 29/08/2023

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması, uygulanması ve sonuçlandırılmasında beni her zaman destekleyen, eğitimimin her dönemi boyunca deneyim, bilgisini, sevgisini ve yardımını esirgemeyen ve anne şefkati ile yaklaşan değerli danışmanım Prof. Dr. Gülgün OKTAY'a,

Desteğini ve şefkatini esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Sezer UYSAL'a ve değerli tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Bilimsel ve akademik hayatla ilgili bilgi ve görüşlerini, desteğini ve deneyimlerini her daim hissettiğim, tez projemde beraber çalışmaktan onur duyduğum Doç.Dr. Cevher GÜNDOĞDU HIZLIATEŞ'e,

Laboratuvar çalışmalarına kazandırdığı büyük katkılarından dolayı, değerli bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren sevgili Dr. Şeniz İNANÇ SÜRER ve Dr. Murat SİPAHI'ye,

Süreç boyunca laboratuvar çalışmalarımda her zaman bilgi ve deneyimlerini paylaştan, beni motive eden, dostluğunu ve sevgisini her daim hissettiren canım arkadaşım Ege Gökçe SAVAŞ'a,

Bu zorlu yolda her zaman bana destek olan, motivasyonumu arttıran ve dostluğunu esirgemeyen sevgili arkadaşlarım başta Hazal PAKER, Yağmur BOZKURT, Yiğit HATİPOĞLU ve İlke ÖKMEN olmak üzere tüm arkadaşlarıma,

Tez ve diğer tüm evraklarımın takibinde büyük duyarlılık gösteren, güler yüzlü anabilim dalı sekreterimiz sevgili Eda Nesrin OLUM'a,

Laboratuvardaki her türlü sorunlarımızla ilgilenen sevgili Emin ÇAVUŞLU'ya,

Her daim ilgisini, şefkatini ve yardımını esirgemeyen sevgili Arife SİVRİ'ye,

Beni hayatım boyunca yalnız bırakmayan ve hayatımın her döneminde destekleyen canım anneannem Özlem İTİL, babam Mahmut İTİL ve ananem Ayşe Gülşen PERİSTER başta olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	
TABLOLAR DİZİNİ .....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	iv
KISALTMALAR .....	vi
ÖZET .....	1
ABSTRACT .....	3
1.GİRİŞ ve AMAÇ .....	5
1.1 Problemin Tanımı ve Önemi .....	5
1.2 Araştırmanın Amacı .....	6
1.3 Araştırmanın Hipotezi .....	6
2. GENEL BİLGİLER .....	7
2.1. Tiroid Kanseri .....	7
2.1.1 Tiroid Kanserinde Sinyal Yolakları .....	9
2.2 Metformin ve Mekanizması .....	14
2.2.1 Metformin Yapısı .....	16
2.3 Nanoteknoloji Tabanlı İlaç Dağıtım Sistemleri (NTİDS) .....	18
2.3.1 Polimer Bazlı Nanopartiküler İlaç Dağıtım Sistemleri .....	20
2.3.2 Poli (D,L-Laktid-Ko-Glikolik Asit)(PLGA) .....	21
2.3.3 Polietilen Glikol (PEG) .....	21
2.3.4 PLGA-PEG Bazlı Nanopartiküller .....	22
3.GEREÇ VE YÖNTEM .....	26
3.1 Araştırmanın Tipi .....	26
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı .....	26
3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi .....	26
3.4 Çalışma Materyali .....	26
3.5 Araştırmanın Değişkenleri .....	26
3.6 Veri Toplama Araçları .....	26
3.6.1 PLGA-PEG-PLGA Kopolimerinin Oluşturulması .....	30
3.6.2 Metformin Yüklü PLGA-PEG Nanopartiküllerinin Oluşturulması .....	31
3.6.3 Saf Metforminin, PLGA-PEG Kopolimerinin ve PLGA-PEG-MET Nanopartikül Sisteminin Karakterizasyonu .....	31

3.6.4 <i>In Vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları.....	32
3.6.5 WST-1 İle Hücre Canlılık Testi.....	32
3.6.6 Koloni Oluşum Testi.....	33
3.6.7 Western Blot Analizleri .....	33
<b>3.7 Araştırma Planı ve Takvimi .....</b>	<b>37</b>
<b>3.8 Verilerin Değerlendirilmesi.....</b>	<b>38</b>
<b>3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları .....</b>	<b>38</b>
<b>3.10 Etik Kurul Onayı.....</b>	<b>38</b>
<b>4.BULGULAR.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Serbest Metformini, PLGE-PEG Polimerinin ve PLGA-PEG-MET Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu .....</b>	<b>39</b>
4.1.1 Serbest Metforminin, PLGA-PEG Polimerinin ve PLGA-PEG-MET Nanopartiküllerinin FT-IR Cihazı ile Karakterizasyonu.....	39
4.1.2 PLGA-PEG Polimerinin ve PLGA-PEG-MET Nanopartikülünün ZetaSizer Cihazı ile Karakterizasyonu .....	41
4.1.3 PLGA-PEG-MET Nanopartikülünün SEM cihazı ile karakterizasyonu ....	43
<b>4.2 WST-1 Testi ile Serbest Metforminin, PLGA-PEG Polimerinin ve PLGA-PEG-MET Nanopartiküllerinin Hücre Canlılığı üzerinde Etkileri.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Koloni Oluşum Testi ile Serbest Metforminin, Cisplatinin, PLGA-PEG Polimerinin ve PLGA-PEG-MET Nanopartiküllerinin Hücre Canlılığı üzerinde Etkileri .....</b>	<b>48</b>
<b>4.4 Serbest Metforminin, Cisplatinin, PLGA-PEG Polimerinin ve PLGA-PEG-MET Nanopartiküllerinin mTOR, AMPK, p-AMPK ve PARP Protein Ekspresyonları Üzerinde Etkisi .....</b>	<b>51</b>
4.4.1 mTOR Protein Ekspresyonu .....	51
4.4.2 AMPK Protein Ekspresyonu .....	53
4.4.3 p-AMPK Protein Ekspresyonu.....	54
4.4.4 PARP Protein Ekspresyonu .....	56
<b>5.TARTIŞMA.....</b>	<b>58</b>
<b>6.SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>65</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>66</b>
<b>8.EKLER.....</b>	<b>79</b>

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Kullanılan kimyasal malzemeler ve marka kodları.....	26
<b>Tablo 2.</b> Kullanılan cihazlar ve marka kodlar .....	28
<b>Tablo 3.</b> Liziz Tamponu .....	34
<b>Tablo 4.</b> SDS-PAGE poliakrilamid jeller .....	35
<b>Tablo 5 .</b> Western Blot analizinde kullanılan çözeltiler.....	36
<b>Tablo 6.</b> PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin boyut (nm), polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel (mv) dağılım ölçümü (n=3).....	43
<b>Tablo 7.</b> Farklı makalelere ait boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel sonuçları .....	59



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Tiroid bezi yapısı .....	7
Şekil 2. Foliküler tiroid hücre kaynaklı tiroid kanserleri .....	8
Şekil 3. Tiroid kanserinde MAPK, PI3K/AKT ve Wnt sinyal yolları .....	10
Şekil 4. Glukoz ve kanserde metformin mekanizması .....	14
Şekil 5. Metforminin yapısı .....	17
Şekil 6. Kanser tedavisinde kullanılan nanopartiküler sistemler .....	19
Şekil 7. Sentetik bazlı polimerler .....	20
Şekil 8. Misel içinde PLGA/PEG kopolimeri ve ilaç sistemi .....	22
Şekil 9. Halka açma yöntemi ile üçlü blok PLGA-PEG'in sentezlenmesi .....	23
Şekil 10. PLGA-PEG-PLGA ko-polimerinin sentezlenmesinde kullanılan mikrodalga ışıma cihazı (BERGHOF, speedwave ENTERY) .....	30
Şekil 11. Çift emülsiyon yöntemleri ile PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin sentezlenmesi .....	31
Şekil 12. SDS Jel Elektroforezi .....	35
Şekil 13. Serbest metforminin FT-IR spektrumu .....	40
Şekil 14. PLGA-PEG polimerinin FT-IR spektrumu .....	40
Şekil 15. PLGA-PEG-MET nanopartikülün FT-IR spektrumu .....	41
Şekil 16. PLGA-PEG-MET nanopartikülünün dinamik ışık saçılımı metodu ile boyut analizi .....	42
Şekil 17. PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin dinamik ışık saçılımı metodu ile zeta potansiyel dağılım analizi .....	42
Şekil 18. SEM cihazı ile 500 nm ölçeğinde PLGA-PEG-MET nanopartikülünün morfolojisi .....	43
Şekil 19. SEM cihazı ile 300 nm ölçeğinde PLGA-PEG-MET nanopartikülünün morfolojisi .....	44
Şekil 20. FTC-133 hücre hattı üzerinde (0,5-64 mM) PLGA-PEG polimerinin 72. saat boyunca etkisi . Veriler ortalama± SEM olarak ifade edildi. ....	46
Şekil 21. FTC-133 hücre hattı üzerinde (0,5-64 mM) serbest metforminin 72. saat boyunca etkisi . Veriler ortalama± SEM olarak ifade edildi. ....	46
Şekil 22. FTC-133 hücre hattı üzerinde (0,5-64 mM) PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin 72. saat boyunca etkisi . Veriler ortalama± SEM olarak ifade edildi. ....	47
Şekil 23. 72 saat boyunca, FTC-133 hücre hattında cisplatinin, PLGA-PEG polimerinin, metforminin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin etkileri. Veriler ortalama± SEM olarak ifade edildi. ....	47
Şekil 24. 8 gün boyunca PLGA-PEG polimeri uygulaması sonrası FTC-133 hücrelerinin koloni görüntüsü .....	48
Şekil 25. Sekiz gün boyunca Cisplatin, serbest metformin ve PLGA-PEG nanopartikülü uygulaması sonrası FTC-133 hücrelerinin koloni görüntüsü .....	49
Şekil 26. Serbest metforminin, Cisplatinin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin FTC-133 hücrelerinde koloni oluşturma verimi (CFE). Veriler ortalama± SEM olarak ifade edildi. ....	50

**Şekil 27.**FTC-133 hücre hattı üzerinde serbest metforminin, cisplatinin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin mTOR protein ekspresyonları üzerinde etkisi . #  $p<0,05$  ..... 52

**Şekil 28.** FTC-133 hücre hattı üzerinde serbest metforminin, cisplatinin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin AMPK protein ekspresyonları üzerinde etkisi . \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,0001$ ..... 54

**Şekil 29.** FTC-133 hücre hattı üzerinde serbest metforminin, cisplatinin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin p-AMPK protein ekspresyonları üzerinde etkisi . \* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,0001$ ..... 55

**Şekil 30.** FTC-133 hücre hattı üzerinde serbest metforminin, cisplatinin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin PARP protein ekspresyonları üzerinde etkisi (Ortalama± Standart hata) ..... 57



## KISALTMALAR

**TK:** Tiroid kanseri

**FTK:** Foliküler tiroid kanseri

**PTK:** Papiller Tiroid Kanseri

**DTK:** Diferansiye tiroid kanseri

**KDTK:** Kötü diferansiye tiroid kanseri

**ATK:** Anplastik tiroid kanseri

**MTK:** Medüller tiroid kanseri

**MAPK:** Mitojenle aktive olan protein kinaz

**RAS:** Proto-onkogen

**PI3K:** Fosfotidilinositol-3-kinaz

**NF- $\kappa$ B:** Nüklör faktör kappaB

**MET:** Metformin

**mTOR:** Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi

**AMPK:** Adenozin monofosfat ile aktifleştirilen protein kinaz

**NTİDS:** Nanoteknoloji tabanlı ilaç dağıtım sistemleri

**PLGA:** Poli-D,L-Laktik-Ko-Glikolik Asit

**PEG:** Poli Etilen Glikolik Asit

**FT-IR:** Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

**SEM:** Taramalı elektron mikroskobu

**WST-1:** 4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3 benzen disulfonat

**IC<sub>50</sub>:** %50 inhibe den konsantrasyon

**BCA:** Biçinkonik asit

**SDS:** Sodyum dodesil sülfat

**PAGE:** Poliakrilamid jel elektroforezi

**CFE:** Koloni oluşum verimi



**Metformin Yüklü PLGA-PEG(Poli-D,L-Laktik-Ko-Glikolik Asit-Poli Etilen Glikolik Asit) Nanopartiküllerinin Sentezlenmesi ve Antikanser Etkilerinin Foliküler Tiroid Kanseri (FTC-133) Hücre Hattı Üzerinde *in vitro* İncelenmesi**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Ezgi İTİL**

**Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**ÖZET**

**Giriş:** Tiroid kanseri (TK), endokrin malignite olan dünya genelinde 9.kanser türüdür. Tiroid kanseri tedavisinde cerrahi, radyoaktif, radyoterapi ve kemoterapi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Fakat bu tedavi yöntemlerinin zararlı yan etkileri ve toksisiteleri nedeniyle etkileri sınırlıdır. Bu gibi tedavilerin problemlerini azaltmak için nanopartiküler ilaç dağıtım sistemleri kullanılır.

**Amaç:** FTC-133 hücre hattı üzerinde serbest metforminin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin etkilerinin incelenmesidir.

**Yöntem:** İlk olarak, çift emülsiyon yöntemi ile metformin yüklü, polimerik PEGillenmiş PLGA (PLGA-PEG-MET) nanopartiküllerinin sentezlendi ve serbest metformin, PLGA-PEG polimerleri, PLGA-PEG-MET nanopartikülleri FT-IR, SetaSizer ve SEM cihazları ile karakterize edildi. WST-1 canlılık testi ve koloni oluşum testi ile üç grubun hücre canlılığı üzerindeki etkileri belirlendi. Ayrıca, Western Blot analizleri ile mTOR, AMPK, p-AMPK ve PARP protein ekspresyonlarına bakıldı.

**Bulgular:** In vitro deneylere göre serbest metformin ve PLGA-PEG-MET nanopartikülleri doza bağlı bir şekilde hücre canlılığında azalma gösterdi. Serbest metforminin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 38.2 mM ve 31.9 mM bulundu. Ayrıca western blot analizlerine göre serbest metforminin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin dozlarına bağlı olarak mTOR ekspresyonunda azalma ve AMPK, p-AMPK ekspresyonunda artış gözlemlendi.

**Sonuç:** Bu bulgular ışığında, PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin tiroid kanseri tedavisinde kullanımı önerilebilir. Bunun için, PLGA-PEG polimeri ile modifiye edilmiş metformin nanopartiküllerinin *in vitro* ve *in vivo* şartlarda teröpatik etkinliğinin geliştirilmesi gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Tiroid Kanseri, Metformin, Nanopartikül İlaç Sistemi, PLGA(Poli-D,L-Laktik-Ko-Glikolik Asit), PEG(Poli Etilen Glikolik Asit)



**Synthesis of Metformin Loaded PLGA-PEG(Poly-D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid-Poly Ethylene Glycolic Acid) Nanoparticles and *In vitro* Investigation of Anticancer Effects on Follicular Thyroid Cancer (FTC-133) Cell line**

**Master Thesis**

**Ezgi İTİL**

**DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE**

**Department of Medical Biochemistry**

**ABSTRACT**

**Introduction:** Thyroid cancer (TC) is the 9th type of cancer worldwide, which is an endocrine malignancy. In the treatment of thyroid cancer, methods such as surgery, radioiodine, radiotherapy and chemotherapy are used. However, the effects of these treatment methods are limited due to their harmful side effects and their toxicities. Nanoparticulate drug delivery systems are used to reduce the problems of such treatments.

**Objective:** The aim of this study is to investigate the effects of free metformin, PLGA-PEG polymer and PLGA-PEG-MET nanoparticles on the FTC-133 cell line.

**Methods:** Firstly, metformin loaded polymeric PEGylated PLGA (PLGA-PEG-MET) nanoparticles were synthesized by double emulsion method and free metformin, PLGA-PEG polymers, PLGA-PEG-MET nanoparticles were characterized by FT-IR, SetaSizer and SEM devices. The effects of the three groups on cell viability were determined by WST-1 viability test and colony formation test. Also, mTOR, AMPK, p-AMPK and PARP protein expressions were analyzed by Western blot analysis.

**Results:** According to in vitro experiments, free metformin and PLGA-PEG-MET nanoparticles showed a dose-dependent decrease in cell viability. The IC50 values of free metformin and PLGA-PEG-MET nanoparticles were 38.2 mM and 31.9 mM, respectively. In addition, according to western blot analysis, a decrease in mTOR

expression and also, a increase in AMPK and p-AMPK expression were observed depending on the doses of free metformin.

**Conclusion:** In the light of these findings, the use of PLGA-PEG-MET nanoparticles in the treatment of thyroid cancer can be recommended. For this, it is necessary to improve the therapeutic efficacy of metformin nanoparticles modified with PLGA-PEG polymer in vitro and in vivo.

**Key words:** Thyroid Cancer, Metformin, Nanoparticle Drug System, PLGA (Poly-D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid), PEG(Poly Ethylene Glycolic Acid)



## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

### 1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Tiroid kanseri sıkça rastlanan endokrin malignitedir (1). Günümüzde hastalığın ölüm oranı sabittir, fakat tiroid kanserinin görülme oranı hızla artmaktadır(2) . Tiroid kanserinin; Papiller tiroid kanseri (PTK), foliküler tiroid kanseri (FTK), kötü diferansiye tiroid kanseri (KDTK), anaplastik tiroid kanseri (ATK) ve medüller tiroid kanseri (MTK) olmak üzere beş çeşidi vardır (1). Tiroid kanserinin ilerlemesinde ve tümör gelişiminde çeşitli moleküler değişiklikler ve çoklu sinyal yolları rol oynar (3). Özellikle, MAPK ve PI3K-AKT-mTOR sinyal yollarının aktivasyonu, tiroid kanserinin başlangıcı ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar (4,5). Tiroid; kan basıncını, vücut ısısını, kalp atış hızını ve bazal metabolizma hızını kontrol eden hormonları salgılamak için iyot kullanır (6). Bu yüzden, günümüzde tiroid kanseri tedavisi için cerrahi ve radyoyot tedavi yöntemleri kullanılır. Fakat, bu tedavi yöntemleri etkili olmasına rağmen, kalıcı hastalık önemli ölçüde artan morbidite ve mortaliteye neden olur (7). Ayrıca, diğer kullanılan tedavi yöntemlerinden biri olan kemoterapi, tekli veya diğer tedavi yöntemleri ile kombine edilerek metastatik ya da ilerlemiş tiroid kanserlerinde kullanılır. Fakat, kemoterapi tedavisi semptomların hafiflemesine yardımcı olsa da, sağkalımı uzattığını gösteren belirli bir kanıt yoktur (8). Ayrıca, kemoterapi ve radyoterapi tedavilerinin kullanımı, zararlı yan etkileri ve hedeflenmemiş doku üzerindeki ekstra toksisiteyi nedeniyle sınırlıdır (9).

Metformin, Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan bir ilaçtır (10). Metformin, hepatik glukoz üretimini, glukoneogenizi ve bağırsak glukoz emilimini azaltırken periferik glukoz alımını artırır. Bu şekilde, kan şekeri ve insülin duyarlılığının kontrolü sağlanmış olur (11). Ayrıca çeşitli kanser türlerinde metforminin antineoplastik etkileri de vardır (10). Yapılan çalışmalarda, metforminin (AMP ile aktive olan protein kinaz) AMPK'yı aktive ederek rapamisinin memeli hedefli (mTOR) inhibisyonuna neden olarak tiroid kanserlerinde apoptozu ilerlettiği gözlemlenmiştir (11). Ancak, metforminin düşük absorpsiyon ve yüksek suda çözünürlüğünden dolayı biyoyararlılığı düşüktür (12). Günümüzde ilaçların bu gibi problemlerini ortadan kaldırmak için nanopartiküler ilaç dağıtım sistemleri kullanılmaktadır (13).

Kanserde kullanılan bu ilaçların sorunlarını gidermek için polimerik miseller, dendrimerler, metalik/inorganik nanopartiküller, nanojeller, silika nanopartiküller, polimerik nanopartiküller kullanılır (14,15). Nanopartiküler ilaç dağıtım sisteminin, kanser tedavisi için gelecek vaat eden bir ilaç dağıtım sistemi olduğu düşünülmektedir. Nanopartiküler ilaç dağıtım sistemlerinin geleneksel ilaç dağıtım sistemlerine göre hassas ilaçların ve proteinlerin yarı ömrünü arttırdığı, hastalıklı bölgelerde ilaçların kontrollü ve hedefli salınımını gerçekleştirdiği, hidrofobik ilaçların çözünürlüğünü arttırdığı gözlemlenmiştir (16).

### **1.2 Araştırmanın Amacı**

Bu çalışmada, çift emülsiyon yöntemi ile metformin yüklü, polimerik PEGillenmiş PLGA (PLGA-PEG-MET) nanopartiküllerinin sentezlenmesi ve PLGA-PEG-MET, PLGA-PEG polimerlerinin, serbest metforminin kimyasal ve nanoboyut özelliklerini FT-IR, SetaSizer ve SEM analizleri ile belirlenmesi hedeflendi. Ayrıca, *in vitro* ortamda, tiroid kanseri hücre hattı (FTC-133) üzerinde uygulanacak deneylerde; WST-1 analizi ile, üç grubun hücre canlılığına olan etkilerinin belirlenmesi, koloni oluşum testi ile üç gruptan etkilenen hücrelerin koloni oluşturma kapasitelerinin belirlenmesi, Western Blot analizleri ile, mitokondriyel enerji metabolizmasında yer alan AMPK, p-AMPK, mTOR, ve apoptoz mekanizmasında yer alan PARP protein ekspresyonları üzerinde üç grubun etkilerinin incelenmesi planlandı.

### **1.3 Araştırmanın Hipotezi**

Bu araştırmamızın hedefi; PLGA-PEG-MET nanopartiküler ilaç sisteminin, *in vitro* ortamda tiroid kanseri hücre hattı üzerinde metforminin etkinliğini arttırmasıdır. Bundan dolayı, araştırmanın hipotezleri aşağıdaki gibidir:

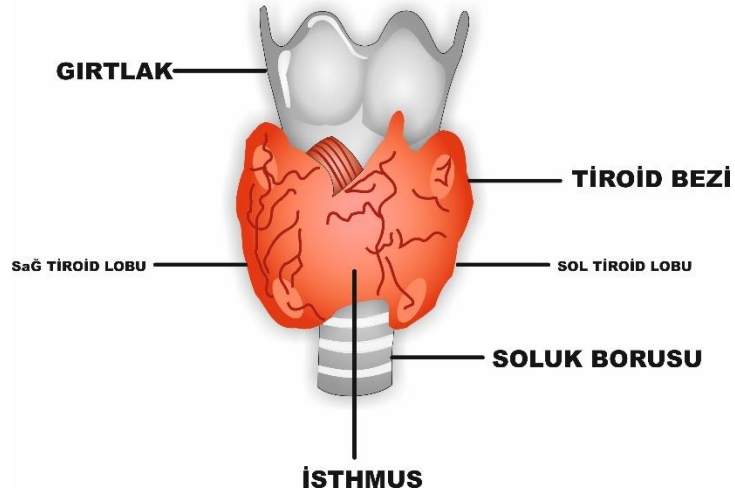
H0: Tiroid kanserinde, PLGA-PEG-MET nanopartikül sisteminin, hücre canlılığı, koloni oluşturma kapasitesi, mitokondriyel enerji metabolizması ve apoptoz mekanizması üzerinde etkisi bulunmamaktadır.

H1: Tiroid kanserinde, PLGA-PEG-MET nanopartikül sisteminin, hücre canlılığı, koloni oluşturma kapasitesi, mitokondriyel enerji metabolizması ve apoptoz mekanizması üzerinde etkisi bulunmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tiroid Kanseri

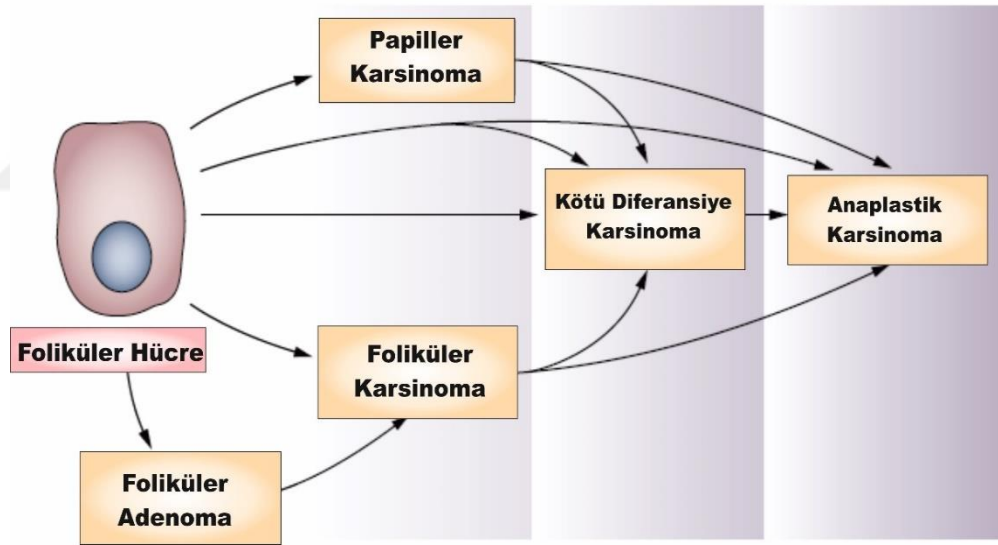
Tiroid, memelilerde soluk borusunun ön tarafında ve gırtlak bölümünün altında bulunan bir endokrin bezidir. Tiroidin yapısı insanlarda kelebek şekline benzemektedir. İsthmus adı verilen dar bir köprü ile birbirine bağlanan iki lobdan oluşur (Şekil 1) (17). Tiroid kanseri (TK), total kanserlerin %2'sini oluşturan, en sık görülen tiroid bezinin malign bir tümörüdür (17,18). Dünya genelinde her yıl yaklaşık 550.000 tiroid kanseri vakası gerçekleşmektedir (19). Pizzato ve arkadaşlarının GLOBOCAN veri tabanından yaptıkları incelemeye göre 2020 yılında küresel olarak, bu hastalığın yakalanma oranları 100.000 kadın da 10.1 vaka ve 100.000 erkek de 3.1 vakadır. Bununla beraber, bu hastalığın ölüm oranları 100.000 kadın da 0.5 vaka, 100.000 erkek de 0.3 vakadır (20). Bu verilerin ışığında ve son 30 yılda yapılan araştırmalara göre, tiroid kanserinin yaygınlığı küresel olarak arttığı fakat ölüm oranının dahi stabil hale geldiği belirlenmiştir (19). Tiroid kanserindeki bu küresel artış, artan değiştirilebilir bireysel risk faktörleri (örneğin, obezite) ve çevresel risk faktörleri (örneğin, iyot seviyeleri), erken tümörlerin tespiti gibi çeşitli faktörlere bağlanmıştır (21).



Şekil 1. Tiroid bezi yapısı (33).

Tiroid kanserinin farklı hücresel kökenlere, prognozlara ve özelliklere sahip bir çok histolojik tipi ve alt tipi vardır. Tiroid kanserlerinin türetildiği iki tip endokrin tiroid hücresi vardır; bunlardan birisi foliküler tiroid hücreleri, diğeri de parafoliküler C hücreleridir (1). Foliküler tiroid hücreleri, iyot alımından ve tiroid hormon

sentezinden sorumludur. Parafoliküler hücreler ise kalsitonin hormonunu üretir ve salgılar (22). Papiller tiroid kanseri (PTK), foliküler tiroid kanseri (FTK), kötü diferansiye tiroid kanseri (KDTK) ve anaplastik tiroid kanseri (ATK) türleri foliküler tiroid hücre kaynaklı kanser tipleridir (Şekil 2) (1). Diferansiye tiroid kanserleri (DTK) sınıfı altında papiller tiroid kanseri (PTK), foliküler tiroid kanseri (FTK) ve Hurthle hücreleri tiroid kanseri bulunur. Papiller tiroid kanseri (PTK), en sık görünen tiroid kanserinin alt tiplerinden biridir. Ayrıca, papiller tiroid kanseri (PTK) en iyi genel prognoza sahiptir. Metastazlar, sıklıkla servikal lenf düğümlerini ve daha az sıklıkla akciğerleri içerir. Foliküler tiroid kanseri (FTK) ve Hurthle hücreleri tiroid kanseri ve kötü diferansiye tiroid kanserleri (KDTK) hematojen olarak uzak bölgelerde yer alan akciğer ve kemiklerde metastaz yapma eğilimi yüksek riskli kanserlerdir (23). Bunun dışında, parafoliküler C hücrelerinden türetilen medüller tiroid kanseri (MTK), tiroid malignitelerinin küçük bir kısmını oluşturur (1).

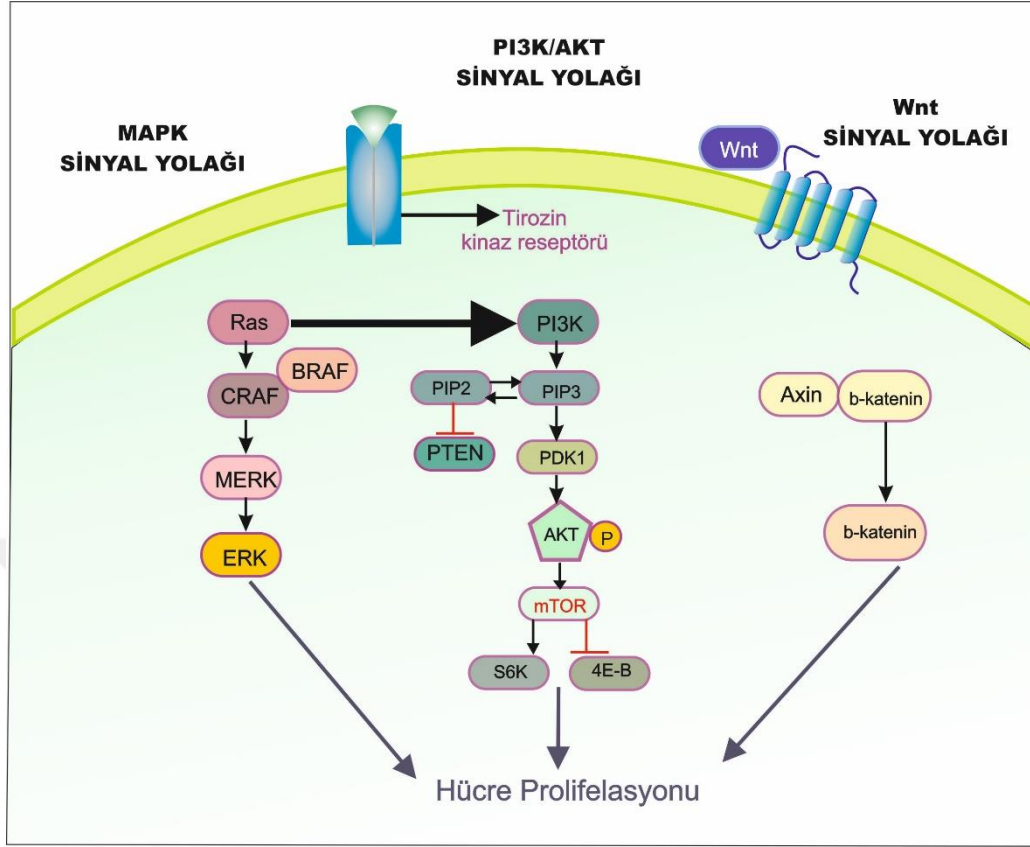


**Şekil 2.** Foliküler tiroid hücre kaynaklı tiroid kanserleri (4).

### ***2.1.1 Tiroid Kanserinde Sinyal Yolakları***

Tiroid kanserinin ilerlemesinde, gelişiminde, invazyonunda ve metastazında çoklu sinyal yolakları ve ilgili moleküllerin işlevleri ile yakından ilişkilidir. Sinyal yolakları her biri, tek başına ya da diğer sinyal yolakları ile işlevlerini gerçekleştirebilirler (24). Yüzlerce bileşenden, farklı hücre lokalizasyonlarından ve hücresel süreçleri düzenleme beceresinden dolayı, sinyal yolaklarının yapısı karmaşıktır (22). Sinyal yolaklarına örnek olarak; MAPK sinyal yolu PI3K/AKT sinyal yolağı, NF-kB sinyal yolağı, Wnt-b-katenin sinyal yolağı verilebilir (25).

MAPK (mitojenle aktive olan protein kinaz) sinyal yolağı, ökaryotik hücre düzenlemesinin en yaygın mekanizmalarından biridir (26). Kanserde MAPK'ın etkinliği, öncelikli reseptör tirozin kinazları, RAS ve BRAF'ı kodlayan genlerin ekspresyonlarını ve mutasyonlarını aktive ederek gerçekleşir (Şekil 3) (27). Aktive olan MAPK sinyal yolağı; apoptoz, hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi biyolojik tepkileri indüklemek için hücre dışı sinyalleri hücrelere ve çekirdeklere iletebilir (24).Yapılan çalışmalarda, papiller tiroid kanserinin (PTK) %40 veya %80'ninde meydana gelen BRAF mutasyonları MAPK sinyalini aktive ederek kanserin tekrarlanmasına ve stabil hale gelmesine sebep olabilir (28).



**Şekil 3.** Tiroid kanserinde MAPK, PI3K/AKT ve Wnt sinyal yolları (22,29).

PI3K(fosfotidilinositol-3 kinaz) /AKT sinyal yolağı hücre proliferasyonunda, büyümesinde ve sağkalımında önemli bir rol oynar. Ayrıca, PI3K-AKT sinyal yolağı, tiroid karsinogenezinde PIK3CA (PI3K'yi kodlayan gen) ve PTEN genlerinde mutasyona sebep olur (30). PTEN, PIP3'ü defosforile ederek PI3K-AKT sinyal yolağını inaktive eden fosfatazdır. Bu yüzden PTEN, tümör baskılayıcı olarak görülebilir (30). PI3K-AKT sinyal yolağı, RAS aktivasyonu ile hücre membranında bulunan tirozin kinaz reseptörleri tarafından indüklenir (22,31). Ayrıca, RAS molekülleri, tirozin kinaz membran reseptörlerinden mitojen sinyalini transkripsiyon faktörlerine iletir (29). RAS mutasyonları ile aktive edilen PI3K, AKT'yi fosforile ederek aktive eder (1). Aktifleşen AKT, mTOR ve birçok onkogeni (örneğin; FOXO1) yukarı regüle ederek tümör oluşumunu tetikler (5). mTOR,serin/teronin yapılı bir protein kinazdır. Bununla beraber, S6K'yı aktive eder ve ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E bağlayıcı proteini (4E-BP) inhibe ederek hücre proliferasyonuna ve protein sentezine sebep olur (Şekil 3)(5). Yapılan çalışmalarda, PI3K-AKT-mTOR sinyal yollarının aktifleşmesiyle papiller tiroid

kanseri (PTK), foliküler tiroid kanseri (FTK) ve anaplastik tiroid kanserinde (ATK) tümör büyümesini arttırdığı belirlenmiştir (1).

NF-kB, tiroid hücrelerinin proliferatif yapısına, antiapoptoz sinyal yollarını kontrol edebilmesi ve bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde rol oynayan transkripsiyon faktörlerinden biridir. Yapılan çalışmalarda onkojenik proteinler olan RAS ve BRAF'ın papiller, medüller ve foliküler tiroid kanserlerinde NF-kB 'nin aktivasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir (32).

Wnt proteinleri, yapısında sistein bulunan, yüksek oranda korunmuş glikoproteinlerdir. Bununla birlikte Wnt proteinleri, embriyonik gelişimde hücre polaritesi ve proliferasyonunda önemli bir rol oynar. Hücre içinde  $\beta$ -katenin bağımlı ve  $\beta$ -katenin bağımsız yollar olmak üzere, Wnt sinyallerini iki yolla iletir. Wnt sinyal yollarında, Axin ve  $\beta$ -katenin gibi bileşenler tiroid kanserinde mutasyona uğrar (Şekil 3). Yapılan çalışmalarda, Wnt-b-katenin sinyal yolağının aktivasyonu anaplastik tiroid kanseri (ATK) ile ilişkilendirilmiştir (33).

### ***2.1.2 Tiroid Kanserinde Tedavi Yaklaşımları***

Günümüzde tiroid kanseri tedavisi için radyoterapi, tirozin kinaz inhibitörleri, cerrahi, immünoterapi, kemoterapi ve radyoiyot gibi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (34–36).

Radyoterapi tedavisinin amacı, cerrahi ve radyoiyodin tedavisi sonrası tekrarlama riski yüksek bölgelerin riskini azaltmaktır (36). Geçmişe ait çalışmalarda, radyoterapinin papiller tiroid kanserine (PTK) sahip olan 45 yaş üzeri kişilerde hastalığın nüksetmesini önlediği belirlendi (37). Fakat, 2008 yılında Dandekar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; ATK tiroid kanser yapısına sahip hastalar üzerinde 6 saat arayla günde iki kez 1.8 ve 2 Gy fraksiyonlarda 60,8 Gy'lik doz kullanıldı. 31 hastada yapılan tedavide; %22 'si tedaviye tam yanıt, %26'si kısmi yanıt vermiştir. Fakat, %15'inde hastalık ilerlemiş ve %37'sinde statik hale gelmiştir. Verilerin ışığında radyoterapi tedavisinin sağkalımı sağlamada başarısız olduğu ve bunun sebebinin tedavinin oluşturduğu toksisiteden olabileceği düşünülmektedir (38).

Radyoiyot tedavisi ile I-131'i (radyoiyodin) hem tiroid kalıntılarının üzerine hem de cerrahi olarak müdahale edilen veya edilemeyen diferansiye tiroid

kanserlerine (DTK) ışınlanır (35). Cerrahi olarak müdahale edilemeyen tiroid kanserinde radyoyot tedavisi ile mortaliteyi azaltması, lokorejyonel tekrarların azaltılması, I-131 bütün vücut sintigrafisi (WBS) ile bilinmeyen metastazların belirlenmesi, uyarılmış serum tiroglobulin (Tg) ölçümünün özgüllüğünü ve I-131 WBS duyarlılığının geliştirilmesi hedeflenmiştir (39,40). 2015 yılında Song ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, diferansiye tiroid kanseri hastalarında radyoyot tedavisinin etkileri incelenmiştir. Araştırmada, I-131 ile tedavi edilen diferansiye tiroid kanserine (DTK) sekonder pulmoner metastazı olan 372 hasta incelendi. Ayrıca, tedavinin yanıtları, göğüs bilgisayarlı tomografisi (BT) ve tedavi sonrası I-131 WBS ile bakıldı. Bununla birlikte serum tiroglobulin (Tg) seviyeleri ölçüldü. Sonuçlara göre, 156 hastada I-131 tedavi sonrası Tg seviyelerinin düştüğü görülmüştür ve 138 hastada pulmoner metastazında azalma belirlenmiştir. Bunun dışında, tam tedavi 62 hastada sağlanmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda diferansiye tiroid kanseri (DTK) kaynaklı pulmoner metastazının I-131 tedavisi ile kısmı veya tam azalma sağlanabileceği gösterilmiştir (41). Fakat, radyoyot tedavisinin kısa ve uzun vadeli yan etkileri olabilir. Kısa vadeli belirtiler arasında; radyasyon tiroidi, tümör şişmesi, gastrit, kserostomi, tat ve koku anormallikleri vardır. Uzun vadeli yan etkilerinde ise ikinci birincil maligniteler, kronik hipospermi ve gözde kuruluk görülebilir (40).

Kemoterapi ile tümörlü bölgeler ilaçlar ile tedavi edilir. Tiroid kanseri tedavisi için doksirobusin, paklitaksel, gemitabin, gefitinib, sorafenib, imatinib, axitinib, sisplatin, siklofosfamid, melfalan ve bleomisin gibi ilaçlar kemoterapi ajanı olarak kullanılmaktadır (42). Geçen yıllarda yapılan bir çalışmada, sorafenib (kinaz inhibitörü) ilacının etkisi tiroid karsinomu hastalar üzerinde belirlendi. Metastatik, iyoda dirençli olan tiroid kanseri hastaları üzerinde günde iki kez 400 mg sorafenib verildi ve etkilerine bakıldı. Sonuçlara göre 30 hastanın 7'si tedaviye kısmi yanıt vermiştir. 17 hastada tiroglobulin (Tg) seviyelerinde %70'e yakın düşüş gösterdi. Bu veriler doğrultusunda sorafenib kemoterapi ajanının, metastatik ve iyoda dirençli tiroid kanserlerinde antitümör aktiviteye sahip olduğu gözlemlenebilir (43). Başka bir çalışmada da, AZD6244 (MEK inhibitörü) olan kemoterapi ajanı ve rapamisin (mTOR inhibitörleri), diferansiye ve anaplastik tiroid kanseri hücre (ATK) hatları üzerinde denendi. Bununla beraber, MAPK ve PI3K-AKT/mTOR sinyal yolları

üzerinde etkisine bakıldı. Sonuçlara göre, BRAF ve PTEN mutasyonlarına sahip hücre hatları üzerinde, MEK ve mTOR inhibitör kombinasyonları %60'ın üzerinde tümör büyümesini inhibe ettiği gözlemlendi (44). Fakat kemoterapinin hastalıklar üzerinde sitotoksik etkisi vardır ve etkinliği sınırlı olabilir (35,42). Bundan dolayı, kemoterapi; radyoterapi veya ilaç dağıtım sistemleri ile kullanılır (42,45).

İmmünoterapi, son on yılda onkologlar tarafından kabul edilen, tümöre özgü antijenik peptitlere karşı bağışıklık oluşturulmasına dayanan tedavi yöntemidir (46,47). İmmünoterapinin amacı; immün kontrol noktalarını immün kontrol noktası inhibitörleri ile kontrol altına almaktır. İmmün kontrol noktaları, bağışıklık tepkisini etkinleştiren veya engelleyebilen moleküler sistemlerdir. Bunların çoğu T lenfositlerindeki reseptörlerin ekspresyonuna dayanır (48). 2017 yılında yapılan çalışmada, PD-1/PDL-1 etkileşimini hedefleyen nivolumab ilacının BRAF mutasyonuna sahip anaplastik tiroid kanseri (ATK) hastaları üzerinde etkisine bakıldı. Yapılan 12 kür nivolumab tedavisinin ardından tümör bölgelerinde küçülme görüldü. Ancak, tedavi sonrası hastalarda kusma, bulantı ve ishal gibi yan etkiler gözlemlenmiştir (49). Yapılan başka bir çalışmada, pembrolizumb ilacının (PD-1 ve ligandları arasındaki ligandları etkileşimi bloke eden, G4/ $\kappa$  anti-PD-1 moloklonal antikor) etkileri, 24 ay boyunca papiller ve foliküler tiroid kanseri hastaları üzerinde incelenmiştir. 10 mg/kg pembrolizumb uygulanan 22 hastanın 15'inde, tümör büyüklüğü %68 oranında azaldığı gözlemlenmiştir. Fakat, ilacın toksisitesinden dolayı, hastalarda doz takviyesi kesilmiştir (50).

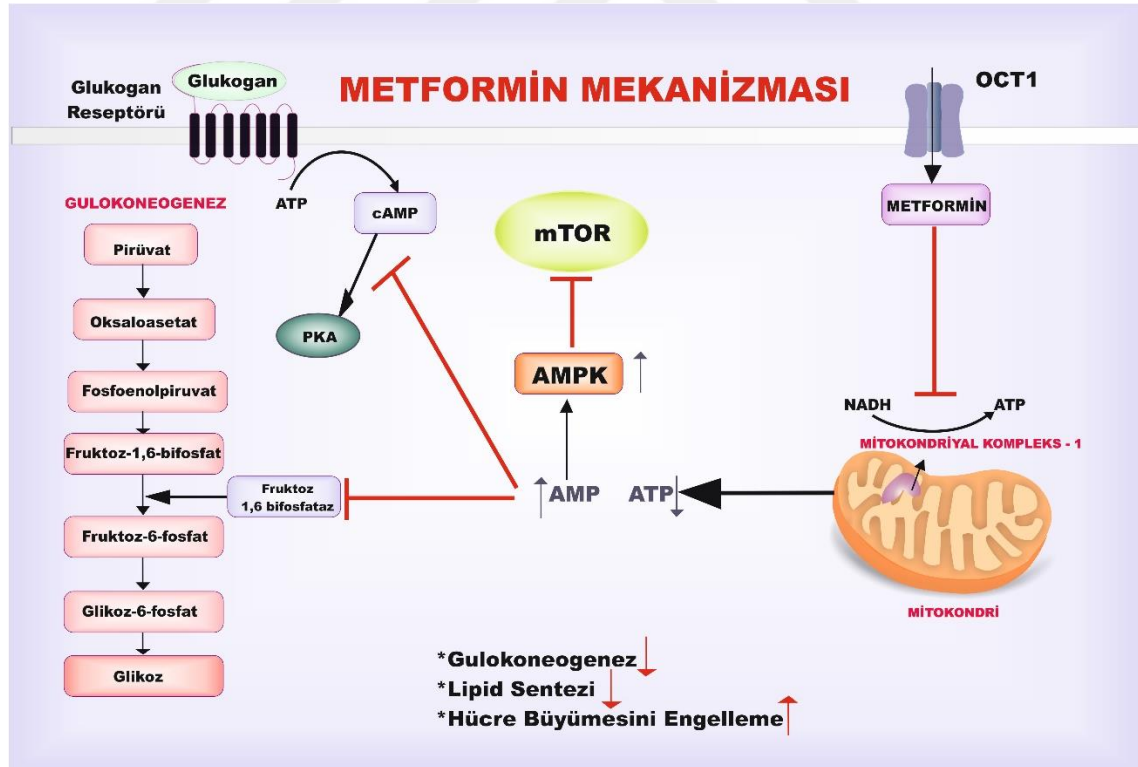
Reseptör tirozin kinazlar, hücrel süreçlerin kilit düzenleyici olan, hücrelerin çoğalmasına aracılık eden, transmembran proteinlerdir (35,51). Reseptör tirozin kinazları hedefleyen tirozin kinaz inhibitörleri, kinazın aktif bölgesini hedefleyerek hücre içi fosforilasyonu ve sinyal iletimini engeller. Böylece, kanserli hücrenin proliferasyonu engellenmiş olurlar (51,52). Genellikle sorafenib, vandetanib, motesanib, gefinitib, imatinib, sunitinib gibi ilaçlar tirozin kinaz inhibitörü olarak kullanılırlar (52). Kurzrozk ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, tirozin kinaz inhibitörü olan cabozantinib ilacın etkilerini medüller tiroid kanseri (MTK) üzerinde incelediler. İlacın toksit etkisinden dolayı 37 hastada maksimum tolere edilen dozda 175 mg cabozantinib kullanıldı. Yapılan incelemede, 17 hastada %30 oranından fazla tümör bölgesin de küçülme gözlemlenmiştir. Fakat, 6 ay boyunca 15 hastada hastalık

stabil hal almıştır (53). Bu tedavi yönteminde; hepatoksisite, hipertansiyon, cilt lezyonları gibi yan etkiler gözlemlenebilir (52).

Bahsedilen tedavi yöntemleri, tiroid kanseri tedavisi için etkili olabilir. Fakat, kullanılan ilaçların ve tekniklerin zararlı yan etkilerinden dolayı, hayatta kalma oranı hala artmamıştır. Bu yüzden gelişen teknolojik sistemlerle farklı tedavi yaklaşımları denenmelidir (17).

## 2.2 Metformin ve Mekanizması

Metformin, guanidin türevi olan insülin duyarlaştırıcı anti-hiperglisemik bir ajandır ve tip II diyabet mellitus tedavisinde kullanılır (10,54). 1997 yılında United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) tarafından yapılan çalışmalarda, 20 yıllık verilerden yararlanarak 5102 hastada hipertansiyon, glisemik seviyeleri, diyabet ve tedavisinde kullanılan ilaçlar incelendi. Veriler doğrultusunda, metformin glukoz kontrolü ile tip II diyabetli hastalarda komplikasyonları azalttığı bulunmuştur. Ayrıca metforminin glisemiye de azalttığı fark edilmiştir (55).



Şekil 4. Glukoz ve kanserde metformin mekanizması (56).

Metformin, insülin duyarlılığını ve kan şekerini kontrol etmek için karaciğerde glukoneogenezini inhibe ederek glukoz çıkışını azaltırken, iskelet kasında

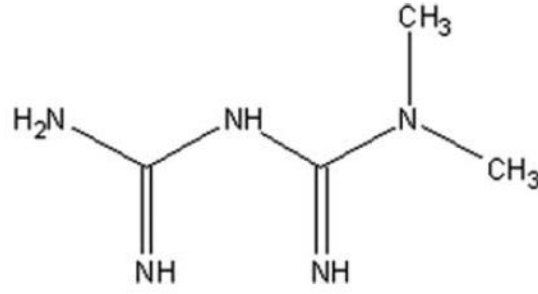
insülin aracılı glukoz alımını artırır (57). Yapılan çalışmalarda, inhibe edilmiş mitokondriyal kompleks I aktivitesi ve azalan glukoneogenez birbirleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu bulgulara göre metformin, OCT1 yoluyla mitokondriyal kompleks I'i inhibe eder. Azalan enerji üretiminden dolayı, hücrede ATP oranı azalırken, AMP konsantrasyonunda artış gerçekleşir ve direk olarak glukoneogenezin inhibisyonuna sebep olur. Başka bir yolla da, artan AMP, allosterik olarak adenilil siklazı ve cAMP-PKA sinyalini inhibe ederek glukoneojenik enzim olan fruktoz-1,6-fosfatazın aktivitesi azalır. Bu şekilde glukoneogenezin inhibisyonu gerçekleşir. Ayrıca, AMPK'nın aktivitesi artar (Şekil 4) (56). Hunter ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışmada bu mekanizmayı desteklemektedir. Yapılan in vivo deneylerde, mutasyona uğrayan ve AMP'ye karşı duyarsız hale gelen fruktoz-1,6-fosfatazın ekspresyonu sonucu tedavide metforminin etkisinin azaldığı belirlenmiştir (58). Bu mekanizmayı destekleyen başka bir çalışmada da, birincil hepatositler üzerinde metformin uygulanarak in vitro deneyler yapılmıştır. Metforminin 125 µM ve üstü konsantrasyonlarında cAMP birikimini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (59).

Son yapılan epidemiyolojik ve laboratuvar çalışmaları, anti-diyabetik ilaç olan metforminin anti-kanser aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Meme, akciğer, pankreas, kolorektal, yumurtalık kanserli hastalarda metforminin tek başına ve diğer tedavilerle kombine olarak kullanıldığı pek çok klinik çalışmalar mevcuttur (60). Kanser hücrelerinde metformin, (AMP ile aktive olan protein kinaz) AMPK aktivasyonunu artırır, aynı zamanda hücre içinde enerji stresine ve apoptoza sebep olur (61,62). AMPK, enerji metabolizmasını düzenleyen, AMP/ATP oranındaki artışla aktive olan heterotrimer protein kinazdır. AMPK'nın aktivasyonu, glikolizi artırırken kolesterol sentezinin inhibisyonuna sebep olur. Ayrıca, AMPK'nın aktivasyonu rampamisinin memeli hedefli (mTOR) inhibisyonuna neden olur (Şekil 4) (61). AMPK aktivasyonu mTOR'un inhibe edildiği iki yol vardır. Birincisi, AMPK, direk olarak tüberoz skleroz kompleks 2'yi fosforile ederek RAS homoloğunun ve mTOR'un inhibisyonuna sebep olan TSC1/TSC2 bileşiklerini aktive edebilir. İkinci olarak, mTOR ve raptoru (mTORC1 bileşeni) inaktive eden 722 ve 792 serin kalıntıları üzerinden mTOR bağlayıcı partner raptorunu direk olarak fosforile eder (63). AMPK aktivasyonu, hücrel metabolizma ile ve hücrel proliferasyonun baskılanmasıyla ilişkilendirilebilir. Han ve arkadaşlarının

yayımladığı makalede, in vitro SW579 tiroid hücre hattında incelenen metforminin, mTOR aracılı tiroid kanseri hücre büyümesini, göçünü ve epitalyal mezankimal dönüşümü (EMT) inhibe ettiği gözlemlenmiştir (3). Ayrıca, Bikas ve arkadaşlarının 2015 yılında yayımladığı makalede, FTC133 ve BCPAP tiroid hücre hatları, yüksek ve düşük glukoz ortamında metformin ile muamele edilerek in vitro çalışmalar yapılmıştır. Bu deneylere göre, metforminin yüksek glukozlu ortamda hücre poliferasyonu inhibe ettiği, düşük glukozlu ortamlarda ise hücre ölümünü indüklediği, endoplazmik retikulum stresine, otofajiye neden olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden, metforminin glukoz inhibitörleri ile kombinasyonunun tiroid kanseri tedavisi için yeni bir strateji olabileceği düşünülmektedir (60). Başka bir çalışmada da, BCPAP ve KTC1 papiller tiroid hücre hatları üzerinde uygulanan metforminin, AMPK seviyelerini yükselttiği, p-mTOR ve p-AKT ekspresyonlarını düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bundan dolayı, metforminin glukoz metabolizmasını hedefleyerek tiroid kanseri tedavisinde alternatif olabilir (11). 2020 yılında yayınlanan makalede de, metformin ve pioglitazone ilaçlarının, anaplastik tiroid kanserinde apoptoz ve mTOR sinyal yolu üzerindeki etkilerine bakıldı. Bunların sonucunda, metformin+pioglitazone ilaç kombinasyonunun, onkogenik genlerin (AKT3, mTOR, PIK3C) seviyesini düşürdüğü gözlemlenmiştir (64).

### **2.2.1 Metformin Yapısı**

Metformin (N', N-dimetil biguanid), biguanid sınıfına aittir ve bir guanid zincirinde iki metil grubu bulunur (Şekil 5) (54,65). Metformin, polar, hidrofilik (log P = -1.43), fizyolojik koşullar altında katyonik yapılıdır ve kuvvetli bazik karaktere sahiptir (pKa= 11,5). Bu nedenle metforminin hücre zarlarından hızlı pasif difüzyonu mümkün değildir (54,66). Bir ilacın, hidrofobik yapıdaki membranda bulunan fosfolipitlere bağlanabilmesi için ilacın polar olamayan hidrokarbon yan zinciri ile lipofilitesinin belirlenmesi gerekir (54). Metformin, guanid sınıfına ait olan fenforminden farklı olarak bir guanidin yan zinciri üzerinde fenil-etil halkasına sahip değildir. Bu sebeple metformin, fenformine göre daha az yağda çözünür lipofilik yapıya sahiptir ve mitokondriyel membran içinde daha düşük bağlanma afinitesine sahiptir (54,67).



**Şekil 5.** Metforminin yapısı (70).

Metformin farmasötik formülasyonlarında hidroklorür tuzu formunda kullanılır. Metformin hidroklorürün yapısı kristal şeklindedir ve rengi beyazdır. Metformin hidroklorürün moleküler formülü  $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$ 'dir. Buna ilaveten moleküler ağırlığı, 165,6 g/mol'dur. Metformin, hidroklorür formunda (1.38 mg/ml) suda serbestçe çözünür (65) .

Metforminin oral biyoyararlanımı %50 ile %60 arasındadır ve oral uygulamadan sonra bağırsakta emilir ve karaciğerde birikir. Metformin reçete edilen hastalar, günlük 1 g veya 2 g doz halinde alır ve bu da 10  $\mu M$  – 40  $\mu M$  plazma metformin konsantrasyonuna yol açar (56). Ayrıca metforminin gastrointestinal emilimi, vücuda alındıktan sonra 6-10 saat arasında gerçekleştirir (65). Bunun dışında metformin, absorpsiyonun ardından hızla dağılır ve plazma proteinlerine bağlanmaz. Metformin renal atılıma uğrar ve 4.0 ile 8.7 saat oral uygulamadan sonra ortalama plazma eliminasyon yarılanma ömrüne sahiptir (68). İlaveten, alınan metformin dozu ile nispi absorpsiyonu arasında ters ilişki vardır. Yapılan çalışmalarda, 250 mg – 2000 mg arasında değişen oral metformin dozlarından sonra metformin biyoyararlılığının %86'dan %42'ye kadar düştüğü görülmüştür (66). Metforminin zayıf absorpsiyon ve düşük emiliminden dolayı; günlük yüksek doz gram seviyeleri ile sık dozaj uygulamalarına sebep olur (12).

Metforminin düşük biyoyararlanımı, kısa yarılanma ömrü, düşük emilim gibi çeşitli problemleri vardır. Bunlardan dolayı, metformin için bölgeye özgü ilaç dağıtım sistemleri gereklidir (69).

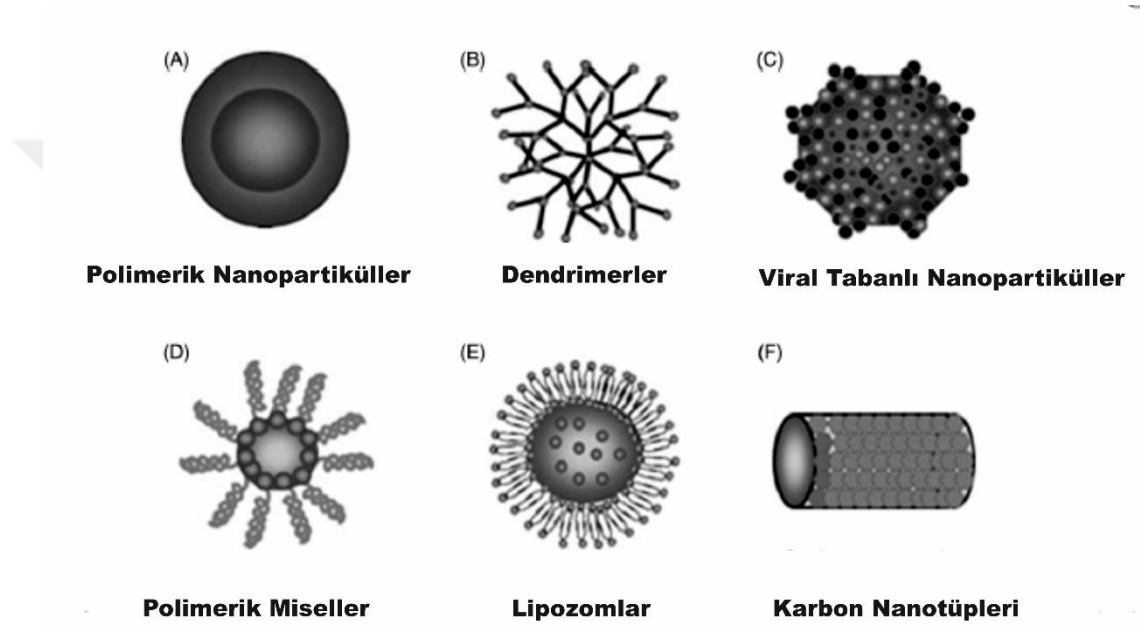
### 2.3 Nanoteknoloji Tabanlı İlaç Dağıtım Sistemleri (NTİDS)

Tedavilerde kullanılan birçok ilaç toksisitesi, zayıf çözünürlüğü ve düşük biyodağılımından dolayı etki bölgesi ile etkileşime giremez. Aynı zamanda zayıf oral emilimi, yetersiz hücresel alımı, ilacın hızlı eliminasyonu gibi problemler ortaya çıkar. İlaçların çıkarttığı bu dezavantaj durumların üstesinden ilaç dağıtımını kontrol ederek gelinebilir (70).

Nanoteknoloji, nanometre ölçeğinde mühendislik malzemeleri ve sistemlerinden oluşan yeni bir alandır. Nanoteknolojinin nanotıp adı verilen bilim dalı ile hastalıkların tedavisi için nanopartiküler ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir (71). Nanopartiküller, 1-100 nm arasında değişen boyutlardaki yapılardır. Optimize edilmiş fizikokimyasal ve biyolojik sistemlere sahip nanopartikül sistemli ilaçlar, hücreler tarafından büyük moleküllerden daha rahat alınır (72). Küçük boyutlu nanopartiküllü ilaçlar ile ilaçların yüzey alanı artar. Bu da ilaçların kan dolaşımında daha hızlı çözünmesini sağlayarak hücre ve dokuda ilaçların hızlı emilmesine yardımcı olur (73). Cabral ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, hem yüksek hem de zayıf geçirgen tümörlerde (kolon adenokarsinomu, pankreas ve stroma) farklı boyutlarda ilaç yüklü polimerik misellerin (30, 50,70,100 nm) etkileri incelendi. In vivo deneylerde, farklı boyutlardaki polimerik misellerin geçirgen tümörlere nüfuz ettiği, 30 nm boyutundaki polimerik misellerin zayıf geçirgen pankreas tümörlerinde antitümör etkisi gözlemlendi (74). Bunların dışında, nanopartiküler sistemler ile ilaç moleküllerinin stabilitesi artar ve sistematik klirensi azalır. Ayrıca, ilaçlar işlevselleştirilir (75). Nanopartiküller, retiküloendotelyal sistemin makrofajlarından kaçabilmek için hidrofilik yüzeye sahip olmalıdır. Bunun için nanopartiküllerin yüzeyleri PEG (polietilen glikol) gibi hidrofilik maddelerle kaplanabilir veya nanopartiküller, hidrofilik ve hidrofobik alanlara sahip kopolimelerden oluşturulabilir (76,77). Nanopartiküler sistemler ile ilaçların fiziksel özellikleri de değiştirilebilir (78). Bunların haricinde, nanopartiküler ilaç sistemleri sinerjik terapötik yanıt elde etmek için çoklu ilaç verme olasılığını artırır (75). İlaçların toksisitesinden kaçınmak için nanopartiküler ilaç dağıtım sistemleri, aktif veya pasif hedefleme sistemleri ile geliştirilebilir (76). Pasif hedeflendirme ile uygun büyüklükte ilaçlı nanopartiküller doğrudan kan damalarından geçer ve ilaç ekstraselüler matrikste salınır, biyoaktivite için doku boyunca dağılır. Aktif

hedeflendirme ile nanopartiküller; hedef dokuda ekstrasvazyona uğrar, nanopartikülün yüzeyindeki ligandlar, hedef hücre veya doku üzerindeki reseptörlere bağlanır ve endositoz aracılığı ile hücre içine alınır (79,80) .

Kanser tedavisinde ilaç dağıtımı için lipozomlar, polimerik nanopartiküller, polimerik miseller, dendrimerler, karbon nanotüpleri, mezogözenekli silikalar, inorganik, nükleik asit bazlı ve manyetik nanopartiküller kullanılır (Şekil 6)(75,76,81,82).



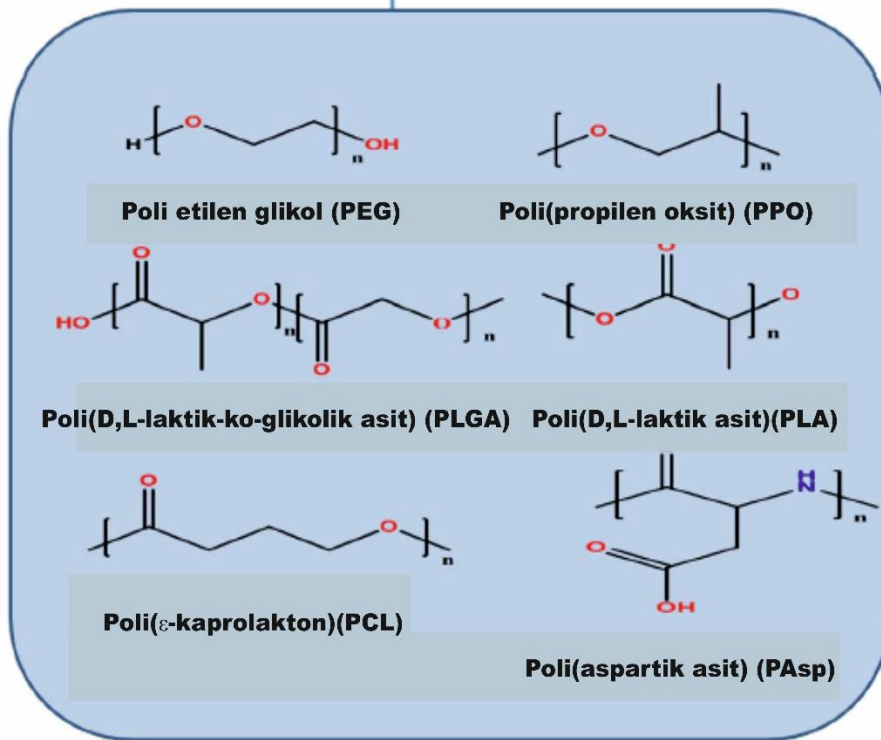
**Şekil 6.** Kanser tedavisinde kullanılan nanopartikül sistemler (76).

Mezogözenekli silika nanopartikülleri, biyolojik olarak parçalanabilir ve yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahiptir. Fakat, erken ilaç salınımlarından dolayı mezogözenekli silikaların yüzeylerinin işlevselleştirilmesi gerekir (83). Herrera ve arkadaşlarının yayınladığı makalede, tip 2 diyabet hastaları için, metformin hidroklorür yüklenen mezogözenekli silika nanopartiküllerini sentezlemişlerdir ve kitosan kullanarak metformin salınımlarının etkisini arttırmayı hedeflemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, kitosan ile kaplanmış mezogözenekli-metformin nanopartiküllerin metformin erken salınımlarını önlemek için bir seçenek olabileceği düşünülmektedir (84). Lipozomlar, amfifil lipid malzemelerinden oluşan çift

katmanla çevrili, hidrofilik çekirdekten oluşan küresel yapılardır. Lipozomlar; katı-lipid parçacıklı, nano yapılı lipid taşıyıcılı, lipid ilaç konjugatlı ve polimer yapılı olmak üzere dört farklı tipte olabilir (85). 2019 yılında yayımlanan makalede, meme kanserinde düşük dozlarda terapötik sonuçlar elde edebilmek için metformin hidroklorür (MET) içeren lipozomal veziküler sistem geliştirilmiştir ve MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında terapötik etkileri gözlemlenmiştir (86).

### 2.3.1 Polimer Bazlı Nanopartiküler İlaç Dağıtım Sistemleri

Polimer bazlı ilaç dağıtım sistemleri; kontrollü ilaç salınımı, tümör dokularına karşı artırılmış ekstrasvazasyonu, ilaç çözünürlüğünü ve stabilitesini arttırdığı için son zamanlarda farmasötik alanda kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır (81). Polimer bazlı ilaç dağıtım sistemlerinin hazırlanma yöntemlerine göre; fiziksel olarak ilaç nanoparçacık matrisine bağlanarak nanoküreler ve nanokapsüller elde edilir veya ilaç polimerik taşıyıcıya kovalent olarak bağlanır. Bu ilaç sisteminde kullanılan polimerler, doğal veya sentetik yapıda olabilirler (87).



Şekil 7. Sentetik bazlı polimerler (88).

Poli(D,L-laktik asit)(PLA), poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli(propilen oksit) (PPO), poli(aspartik asit) (PAsp) ve poli( $\epsilon$ -kaprolakton)(PCL) gibi biyolojik olarak parçalanabilen sentetik polimerler, poli etilen glikol (PEG) ile birlikte terapötik bileşikleri kapsüllemek için polimerik nanopartiküller olarak kullanılırlar (Şekil 7) (88,89).

Bu sentetik malzemeler ile ilaçlı nanopartiküllerin sentezi için ilk olarak emülsifiye sistemi oluşturulur, ikinci olarak da emülsiyon solvent difüzyonu, tuzlama, emülsiyon buharlaştırma ve nanopresipitasyon yöntemleri kullanılır (90).

### **2.3.2 Poli (D,L-Laktid-Ko-Glikolik Asit)(PLGA)**

PLGA, laktid asit ve glikolik asitten oluşan biyoyumlu ko-polimerlerdir. Aynı zamanda, PLGA'nın biyolojik olarak parçalanabilen yapısından dolayı metabolik yollarda PLGA polimerleri ester bağı üzerinden hidrolize uğrayarak laktik asit ve glikolik asit monomerleri ortaya çıkar ve vücuttan atılan toksik olmayan son ürünlerle ( $H_2O$  ve  $CO_2$ ) krebs döngüsü boyunca metabolize edilir (91,92). Doksorubisin, 5-florourasil, paklitaksel, kamptotesin gibi hidrofobik veya hidrofilik ilaçlar ile PLGA kullanılarak nanopartiküler ilaçlar oluşturulmuştur (81,91). Al-Nemrawi ve arkadaşlarının 2021 yılında yayınladığı makalede, kitosan ve folik asit konjugatları ile doksorubisin yüklü PLGA nanopartikülleri geliştirildi ve düşük pH'a sahip, folat reseptörlerinin fazla eksprese olduğu kanser hücrelerinde denendi. Yapılan *in vitro* deneylerde, PLGA nanopartikülleri serbest doksorubisin ile karşılaştırıldığında kanserli hücre hatlarında (RPMI 2650, A549, Calu-53) hücre canlılığını azalttığı belirlendi. Verilere göre PLGA nanopartiküllü bileşenler toksikliği azaltabilir, kanser tedavisinde güvenli olabilir (93).

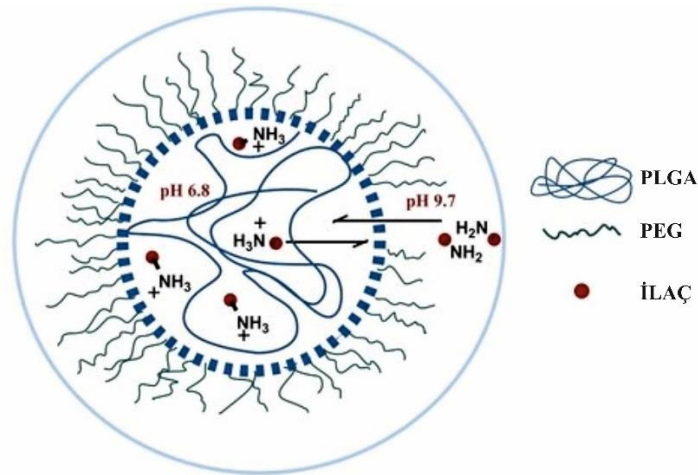
### **2.3.3 Polietilen Glikol (PEG)**

Polietilen glikol (PEG), hidrofilik ve lineer yapıda, düşük polidispersiteye sahip, etoksi birimlerinden oluşan, elektriksel olarak nötr olan polimerlerdir (10,94). Nanopartiküllerin PEG ile kaplanmasıyla yüksek iyonik kuvvetli ortamlarda (Van Der Waals etkileşimi olan biyolojik ortamlar) nanopartiküller stabilize edilebilir (95). PEG, biyolojik olarak parçalanabilen yapısından dolayı yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahiptir ve dolaşımda nanopartiküler sistemler, ilaçların yarı ömrünü uzatır (88). PEG ile ilaçlar, polipeptitler, proteinler, DNA ve RNA gibi

makromoleküllerin konjugasyonu yapılarak çalışmalar yapılmıştır. Bunun dışında, PEG hidrofobik ilaçlarla etkileşime girerek sulu ortamlarda çözünürlüğü artırır (96). 2018 yılında Goudarzi ve arkadaşlarının yayınladığı makalede, PEG-PLA (poli laktik asit) yüklü nisin nanopartiküllerin, gastrointestinal (AGS ve KYSE-30), karaciğer (HepG2) ve kan (K562) kanser hücre hatları üzerinde etkilerine bakılmıştır. İn vitro deneylere göre nisin yüklü PEG-PLA nanopartikülleri serbest nisine göre hücre canlılığını daha fazla inhibe etmiştir ve apoptozu indüklemiştir. Bunlarla beraber vero (tümör olmayan) hücre hattı üzerinde nanopartiküllü nisin sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir (97). Ayrıca Lee ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınladığı makalede, PEG yüklü metformin-herceptin konjuge lipozomlar (HER-LP-MET-PEG) geliştirilerek meme kanseri hücre hatlarında denenmiştir. İn vitro yapılan deneylerde, HER-LP-MET-PEG nanopartikülleri serbest metformine göre meme kanseri kök hücrelerinde (BCSC) daha fazla inhibisyona neden olmuştur ve doza bağlı olarak anti-poliferatif etki göstermiştir (98).

#### 2.3.4 PLGA-PEG Bazlı Nanopartiküller

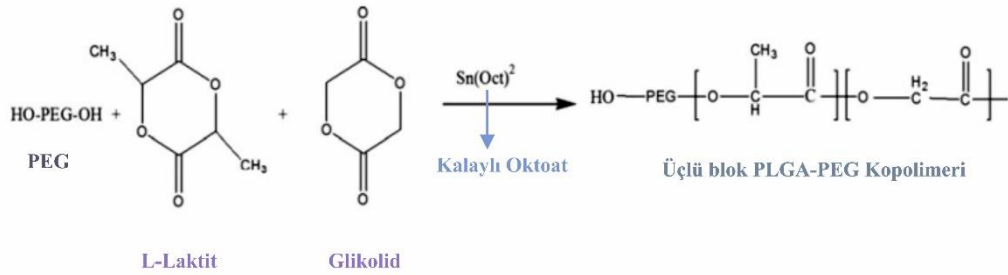
PEG, PLGA ile nanopartiküler ilaç sistemleri geliştirildiğinde ilaç stabilitesini ve kinetik stabiliteyi arttırdığı, terapötik indeksi ve nanopartiküllerin hedef bölgeyi iyileştirdiği belirlenmiştir (99)(105). PLGA ile PEG, ikili veya üçlü blok kopolimerleri oluşturacak şekilde nanopartiküler ilaç taşıma sistemleri içinde kullanılmaktadır (Şekil 8) (82).



Şekil 8. Misel içinde PLGA/PEG kopolimeri ve ilaç sistemi (100).

İkili blok PLGA-PEG blok kopolimerlerinde PEG zincirleri, misel sistemleri içinde kendisini dışa yönlendirerek bariyer görevi görür ve sterik itme ile yabancı maddelerle olan etkileşimi azaltır (101). 2022 yılında yayımlanan makalede, çift emülsiyon ve nano presipitasyon yöntemleri ile ikili blok PLGA-PEG polimerleri ve antimikrobiyal hidrofilik peptidi (H-Ser-Pro-Trp-Thr-NH<sub>2</sub>, FS10, RNAIII inhibe edici peptid ile ilişkili) nanopartikül haline getirildi. In vitro salınım deneyleri sonuçlarına göre, nanopartiküllü ilaç sisteminin ilaç verimliliğini arttırdığı ve uzun süreli ilaç salımına sahip olduğu belirlendi (100).

Kovalent olarak birleştirilen üçlü blok kopolimerleri (PLGA/PEG (A-B-A/B-A-B)) oda sıcaklığında akışkan bir çözelti iken, vücut sıcaklığında ise yarı geçirgen jel yapısındadır (82,102). PEG molekülünün dehidrasyonu ile jelleşen termosensitif üçlü PLGA-PEG kopolimerleri, suda çözünmeyen nanopartiküler taşıyıcı olarak veya polimer çözeltisi olarak kullanılabilirler (103). Üçlü blok PLGA-PEG kopolimerlerinin sentezlenmesinde; tuzla çökeltme, nano çökeltme, emülsifikasyon çözücü difüzyon/buharlaştırma, klasik halka açma polimerizasyonu metodu, süperkritik CO<sub>2</sub> ile halka açma polimerizasyonu metodu ve mikrodalga ışıması ile halka açma polimerizasyonu metodu gibi yöntemler kullanılabilir (101,104–106).



**Şekil 9.** Halka açma yöntemi ile üçlü blok PLGA-PEG'in sentezlenmesi (107).

Halka açma polimerizasyonu, bir polimer zincirinin terminal ucundaki reaktif kısımla (iyonik, kationik, radikal) siklik bir monomer ile reaksiyona girmesiyle daha uzun polimer zinciri oluşturmak için halkalı yapının açıldığı reaksiyondur (108). Bu yöntemde, fiziksel koşullardaki ve kimyasal yapıda olan değişiklikler halkalı yapının polimerizasyonunun üzerinde farklı etkileri olabilir (109). Üçlü blok PLGA-PEG kopolimerleri; L-laktid, glükolid, ve PEG malzemeleri kullanılarak halka açma

polimerizasyon metodu ile hazırlanabilir (Şekil 9) (107). Halka açma polimerizasyon yöntemi ile sentezlenen üçlü blok PLGA-PEG kopolimerlerinin reaksiyonu sırasında kalaylı oktoat katalizör olarak kullanılır (110).

Khodaverdi ve arkadaşlarının yayınladığı makalede, PLGA-PEG-PLGA kopolimerleri mikrodalga ışıması kullanılarak halka açma polimerizasyonu metodu ile sentezlenip naltrekson ve B12 vitamini ile konjuge edilmiştir. Bununla birlikte, klasik ve mikrodalga ışımaya kullanılan halka açma metotları karşılaştırılmıştır. Karakterizasyon deney sonuçlarına göre, mikrodalga ışımaya yoluyla kopolimerizasyon işleminin hızı ve verimi klasik yöntemle göre daha yüksek sonuçlar vermiştir (111). Yapılan başka bir çalışmada, üçlü blok PEG-PLGA-DTX (dosetaksel) nanopartikülleri klasik halka açma polimerizasyon ve emülsiyon solvent buharlaştırma yöntemleri ile geliştirilerek MCF-7 ve C26 hücre hatları üzerinde ve katı tümörlerde (C26 kolon adenokarsinomu) etkileri incelenmiştir. Deney sonuçlarına göre üçlü blok PEG-PLGA-DTX nanopartiküllerinin, hücre hatları üzerinde canlılığı inhibe ettiği ve katı tümörlerde ilaç birikimini sağlarken ilacın biyolojik yarı ömrünü arttırdığı görülmüştür (112). 2020 yılında Amirsaadet ve arkadaşlarının yayınladığı makaleye göre klasik halka açma polimerizasyon ve çift emülsiyon yöntemleriyle sentezlenen metformin (MET) ve silibinin (SIL) yüklü üçlü blok PLGA-PEG nanopartiküler sistemlerinin, meme kanseri T47D hücre hattı üzerinde gösterdikleri etkiler incelenmiştir. Üçlü blok PLGA-PEG ile MET ve SIL'in kapsüllenmesi ile, ilaçların saf formlarına göre T47D hücrelerinde proliferasyonu azaltmada daha etkili olduğu görülmüştür (113). Ayrıca Faramarzi ve arkadaşlarının yayınladığı makalede de; Metformin ilacı, klasik halka açma polimerizasyon yöntemiyle sentezlenen üçlü blok PLGA-PEG ile nanopartikül haline getirilerek SKVO3 yumurtalık karsinomu hücreleri üzerinde uygulanmıştır. Yapılan in vitro deneylere göre, nanopartiküllü metforminin serbest metformine göre hücre canlılığını inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, nanopartiküllü metforminin, BAX ve kaspaz-3'ün ekspresyonlarını artırarak apoptozu indüklediği belirlenmiştir (114).

Metformin ve PLGA ile oluşturulan nanopartiküler sistemlerin kullanıldığı meme, kolon ve yumurtalık gibi kanser türlerinde çalışmalar yapılmışken tiroid kanserinde bu tür nanopartiküler sistemlerin anti-kanser etkinliğinin araştırılmasıyla ilgili güncel bilgiye rastlanmamıştır (112–114). Bundan dolayı, mikrodalga ışıması

kullanılarak halka açma polimerizasyonu metoduyla sentezlenen PLGA-PEG kopolimeri ile nanopartikülü oluşturulan metforminin, tiroid kanseri hücreleri üzerinde etkili olup olmadığını incelemek araştırmanın özgün yönlerinden biridir.



### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Araştırmanın Tipi

Araştırmanın tipi; deneysel (in vitro) bir araştırmadır.

#### 3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, literatür taraması ile Nisan 2021 'de başlamış, Ağustos 2023'de tez savunması ile sonlanmıştır. Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi (İBG), Dokuz Eylül Üniversitesi Elektronik Malzemeler Üretim ve Uygulama Merkezi'nde (EMUM) gerçekleştirilmiştir.

#### 3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Bu araştırmanın evreni ve örnekleme, in vitro hücre kültürü deneylerinden dolayı bulunmamaktadır.

#### 3.4 Çalışma Materyali

Tiroid hücreli kanser hastasından elde edilen FTC-133 hücre hattı in vitro deneyler için kullanılmıştır.

#### 3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişkenler metabolik ilaç (metformin), PLGA-PEG ko-polimeri ve PLGA-PEG'in konjugasyonu ile elde edilen Metformin nanopartiküler ilaç taşıma sistemi; bağımlı değişkenler ise nanopartiküler ilaç dağıtım sisteminin boyut, yük, moleküler bilgileri (SetaSizer, SEM, FT-IR), hücre canlılığı, koloni oluşumu ve protein ekspresyonlarıdır (mTOR, PARP, AMPK, p-AMPK).

#### 3.6 Veri Toplama Araçları

Projede kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 1'de ve cihazlar ise Tablo 2'de gösterilmektedir.

**Tablo 1.** Kullanılan kimyasal malzemeler ve marka kodları

Malzeme	Marka, Kod Numara	Kullanım Amacı
D,L laktid	SIGMA, 303143-25G	Nanopartikül sentezi
Glikolid	SIGMA, G1796-25G	Nanopartikül sentezi
Kalaylı Oktoat	SIGMA, S3252-100G	Nanopartikül sentezi

PEG4000	Merck, M807490.1000	Nanopartikül sentezi
Diklorometan	Merck, M106050.2500	Nanopartikül sentezi
Polivinil Alkol	SIGMA,36027-25G	Nanopartikül sentezi
Metformin HCl	Cayman Chemicals, 1.800.364.9897	Nanopartikül sentezi, <i>In vitro</i> WST-1 canlılık testi, Koloni oluşum testi, Western Blot analizleri
DMEM-F12 ortam	Thermo Scientific, 11320-074	<i>In vitro</i> hücre kültürü çalışmaları
FBS	Thermo Scientific, 102070-106	<i>In vitro</i> hücre kültürü çalışmaları
Penisilin/Streptomisin	Thermo Scientific, 15140-122	<i>In vitro</i> hücre kültürü çalışmaları
Tripsin/EDTA	Thermo Scientific, 25200-065	<i>In vitro</i> hücre kültürü çalışmaları
Tripan mavi boyası	Biochrom, L6323	<i>In vitro</i> hücre kültürü çalışmaları
PBS	Thermo Scientific, 70011-036	<i>In vitro</i> hücre kültürü çalışmaları
WST-1	Roche, 5015944001	<i>In vitro</i> canlılık testi
Kristal Viole	SIGMA, 32675-25G	<i>In vitro</i> , koloni oluşum testi
Akrilamid	SIGMA, A3553-100G	Western Blot analizleri
TEMED	SIGMA, T7024-100ML	Western Blot analizleri
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	SIGMA, L-4390	Western Blot analizleri
Amanyompersülfat (APS)	SIGMA, A3678-100G	Western Blot analizleri
N,N'metilen bisakrilamid	SIGMA, M7279	Western Blot analizleri
İzoproponal	Riedel de Haen	Western Blot analizleri
Tris Baz	SIGMA, T6066	Western Blot analizleri

$\alpha$ -Aktinin antikor	Cell Signalling, 6487S	Western Blot analizleri
mTOR primer antikor	Cell Signalling, 2983S	Western Blot analizleri
p-AMPK	Cell Signaling, 2531S	Western Blot analizleri
PARP primer antikor	Cell Signalling, 9532S	Western Blot analizleri
AMPK primer antikor	Cell Signalling, 5831S	Western Blot analizleri
BCA protein tayin kiti	Thermo Scientific, 23225	Western Blot analizleri
Protein Molecular Weight marker	Thermo Scientific, 26625	Western Blot analizleri
PVDF Membran	Millipore, IPVH00010	Western Blot analizleri
Whatmann kağıdı	Bio-Rad, 1703932	Western Blot analizleri
ECL	Millipore, WBLUF0500	Western Blot analizleri

**Tablo 2.** Kullanılan cihazlar ve marka kodlar

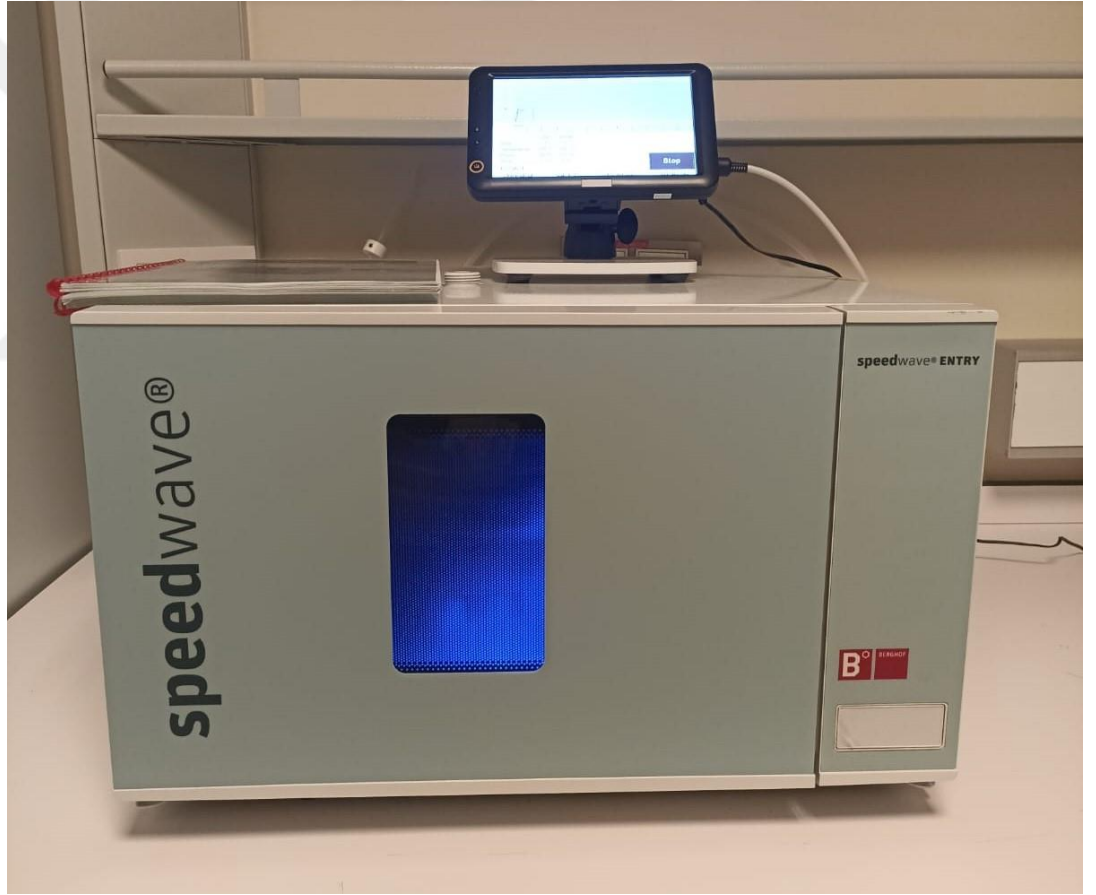
<b>Cihaz</b>	<b>Marka, Kod Numarası</b>	<b>Kullanım Amacı</b>
Mikrodalga ışıma cihazı	BERGHOF, speedwave ENTRY	Nanopartikül Sentezi
Döner evaporatör	Heidolph	Nanopartikül Sentezi
Ultrasonik prob	-	Nanopartikül Sentezi
FT-IR cihazı	Perkin Elmer, Spectrum BX	Sentez Karakterizasyonu
ZetaSizer cihazı	Malvern, Nano ZS	Sentez Karakterizasyonu
SEM cihazı	COXEM EM-30 Plus	Sentez Karakterizasyonu
CO <sub>2</sub> inkübatörü	Thermo Scientific, 311	<i>In vitro</i> , hücre kültürü çalışmaları
Mikroskop	Nikon, ECLIPSE TS100	<i>In vitro</i> , hücre kültürü çalışmaları
Santrifüj cihazı	Hettich, 320R	Nanopartikül sentezi ve <i>In vitro</i> , hücre kültürü çalışmaları
Elektroforez sistemi	Biorad	Western Blot Analizi
Güç kaynağı	Biorad, PowerPac Basic	Western Blot Analizi
Wet transfer sistemi	Biorad, Mini Trans Blot	Western Blot Analizi
Güç kaynağı	Biorad, Power Pac Hc	Western Blot Analizi
pH metre	Selecta, 41200500	Western Blot Analizi
Vorteks	Hedidolph, REAX Top	<i>In vitro</i> , hücre kültürü çalışmaları ve Western Blot analizi
Derin dondurucu -80°C	Thermo Scientific, Forma	Örneklerin saklanması

		Model 705	
Derin dondurucu	-20°C	Ariston, Hotpoint	Örneklerin ve malzemelerin saklanması
Derin dondurucu	4°C	Ariston, Hotpoint	Malzemelerin saklanması



### 3.6.1 PLGA-PEG-PLGA Kopolimerinin Oluşturulması

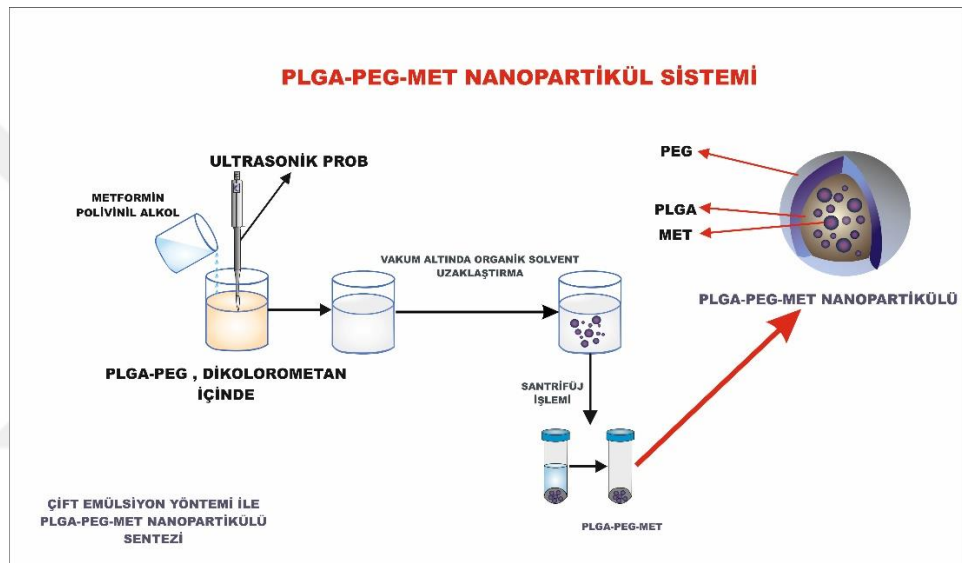
PLGA-PEG-PLGA ko-polimerinin sentezlenmesi için mikrodalga ışma cihazı (BERGHOF, speedwave ENTRY) kullanılarak halka açma polimerizasyon yöntemi kullanıldı (115). İlk önce PEG4000 (polietilen glikol- 4 g), 800 W, 250 rpm, 120 ° C' de 10 dakika boyunca karıştırıldı. D,L laktid (2,836 gr) ve glikolid (0,782 gr) ilave edildi, karışım 800 W, 250 rpm, 150 ° C'de 5 dakika boyunca eritildi. Daha sonra kalaylı oktoat (10 µl) ilave edildi, sistem 800 W, 250 rpm, 150 ° C'de 5 dakika boyunca karıştırıldı. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen ürünün saflaştırılması için ko-polimer soğuk su (4 ° C) içinde çözdürüldü ve sıcaklık 60 ° C'ye kadar çıkarılarak polimer çökelti haline getirildi.



**Şekil 10.** PLGA-PEG-PLGA ko-polimerinin sentezlenmesinde kullanılan mikrodalga ışma cihazı (BERGHOF, speedwave ENTRY)

### 3.6.2 Metformin Yüklü PLGA-PEG Nanopartiküllerinin Oluşturulması

Çift emülsiyon yöntemi (Su/Yağ/Su) ile metformin yüklü PLGA-PEG sentezlendi (113). 200 mg PLGA-PEG ko-polimeri 5 mL diklorometan içinde çözüldü. İkinci olarak, 20 mg metformin (MET), polivinil alkol (PVA, %0,5 w/v) içerisinde çözüldü ve organik faza eklendi. Ultrasonik prob ile 20 dakika boyunca karışım emülsifiye edildi. Diklorometan, 40 ° C'de döner buharlaştırıcı vakum ile uzaklaştırıldı. PLGA-PEG-MET nanopartikülleri 15.000 rpm'de santrifüj yapılarak biriktirildi (Şekil 8).



**Şekil 11.**Çift emülsiyon yöntemleri ile PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin sentezlenmesi.

### 3.6.3 Saf Metforminin, PLGA-PEG Kopolimerinin ve PLGA-PEG-MET Nanopartikül Sisteminin Karakterizasyonu

FT-IR (Perkin Elmer, Spectrum BX) analizi ile saf metforminin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerin moleküler yapısı belirlendi. KBr disklerinde hazırlanan örneklerin IR spektrumları, 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  aralığındaki bölgede incelendi.

ZetaSizer (Malvern Nano ZS) analizi ile serbest metforminin, PLGA-PEG kopolimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerin boyutları belirlendi. Ölçüm, 90° açıdaki dedektör ve Dinamik Işık Saçılımı (DLS) modeli ile yapıldı.

SEM (COXEM EM-30 Plus) ile PLGA-PEG-MET nanopartiküllerin morfoloji ve şekil yapısı görüntülendi. Örnekler altın/paladyum (Au/Pd) ile kaplandı.

### **3.6.4 In Vitro Hücre Kültürü Çalışmaları**

İnsan Foliküler Tiroid karsinom hücre hattı (FTC-133), 2.5 mM glutamin, 100 U/MI penisilin, 100 ug/mL streptomisin, %10 fetal bovin serum (FBS) içeren DMEM-F12 ortamında kültüre edildi. Hücreler normoksik koşullarda 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> nemli inkübatör içerisinde inkübe edildi.

Hücre sayımı ve canlılığı için %0.4 tripan mavisi çözeltisi kullanıldı ve Neubauer lamında mikroskopik olarak incelendi. Membran yapısı bozulmuş hücrelerin tripan mavi ile boyanmasına göre canlı ve ölü hücreler sayılarak canlı hücre sayısı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

Hücre sayısı (hücre sayısı/mL) = Ortalama hücre sayısı x seyreltme faktörü x 10<sup>4</sup>

#### Çalışma Grupları:

- 1.Grup: Medium(Ortam)+ Hücre Kültürü (kontrol)
- 2.Grup: Hücre Kültürü + Metformin (1.doz)
- 3.Grup: Hücre Kültürü+ Metformin (2.doz)
- 4.Grup: Hücre Kültürü + PLGA-PEG Polimerleri
- 5.Grup: Hücre Kültürü + PLGA-PEG-MET (1.doz)
- 6.Grup: Hücre Kültürü + PLGA-PEG-MET (2.doz)

### **3.6.5 WST-1 İle Hücre Canlılık Testi**

Saf metforminin, PLGA-PEG kopolimerinin, PLGA-PEG-MET nanopartiküllerin hücre canlılığı üzerindeki etkisi (4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3 benzen disulfonat) reaktifi kullanılarak incelendi. WST-1 yöntemi, tetrazolyum tuzu WST-1'in mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından suda çözünebilir formozan kristallerine bölünmesine dayanır (116). Bu testte, 96 kuyucuklu mikroyuğa (3 tekrar) 100 µl DMEM-F12 ortamı içerisine 5000 hücre ekildi. Hücrelerin yüzeye tutunması için 24 saat boyunca CO<sub>2</sub> inkübatörü içerisinde bekletildi. Kontrol ve deney gruplarına (0,5 mM - 64 mM) farklı konsantrasyonlarında ilaçlar verildi. 96 kuyucuklu mikroyuğalar CO<sub>2</sub> inkübatöründe

72 saat boyunca bekletildi. İnkübasyon sonrası, ışıksız ortamda 10 µl WST-1 reaktifi eklendi ve 3 saat boyunca inkübe edildi. 3.saatlerde, plak okuyucuda 450 nm dalga boyunda absorbanları (ABS) kaydedildi. Bununla birlikte % canlılık ve % sitotoksite hesaplandı. Ayrıca, her ilaç için hücre canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyonları (IC<sub>50</sub>), Prism GraphPad ile hesaplandı.

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Ortalama Örnek ABS} / \text{Ortalama Kontrol ABS}) \times 100$$

### **3.6.6 Koloni Oluşum Testi**

FTC-133 hücrelerinde saf metforminin, PLGA-PEG kopolimerinin, PLGA-PEG-MET nanopartiküllerin klonojenik sağ kalım üzerindeki etkisi hücrelerin koloni oluşturma kapasitesine göre belirlendi. Koloni oluşum testi, Mosmann T'nin yönteminden yararlanılarak yapıldı. Bu teste göre, hücreler sayıldıktan sonra 6 kuyulu plağın her kuyusuna 300 hücre ekildi ve hücrelerin yüzeye tutunması için 24 saat beklendi (117). Bu evreden sonra (16 mM, 32 mM) ajanlar ile muamele edildi. Hücrelerin koloni oluşumu için 1-2 hafta boyunca beklendi. Koloni oluşumu gözlemlendikten sonra % 4 paraformaldehit ile oda sıcaklığında 30 dakika boyunca fikse edildi ve % 1 Kristal violeye ile koloniler boyanarak 1 saat bekletildi. UVP Jel Dokümantasyon cihazında kuyuların görüntüsü alınarak koloni sayımı yapıldı. Aşağıdaki formül kullanılarak koloni oluşum verimi (CFE) hesaplandı.

$$\text{Koloni Oluşum Verimi (CFE)} = \text{Tedavi Edilen Kolonilerin Ortalaması} / \text{Kontrol Grubu Kolonilerin Ortalaması} \times 100$$

### **3.6.7 Western Blot Analizleri**

FTC-133 hücrelerindeki mitokondriyal enerji metabolizmasında yer alan AMPK, mTOR ve apoptoz mekanizmasında rol oynayan PARP protein ekspresyonları Western Blot yöntemi ile incelendi. FTC-133 hücreleri RIPA lizis tamponunda ve proteaz/fosfotaz inhibitörleri ile vortexlenerek lize edildi (Tablo 3). Lize edilen örnekler 10.000 g' de 15 dakika boyunca +4°C' de santrifüj edildi.

**Tablo 3.** Liziz Tamponu

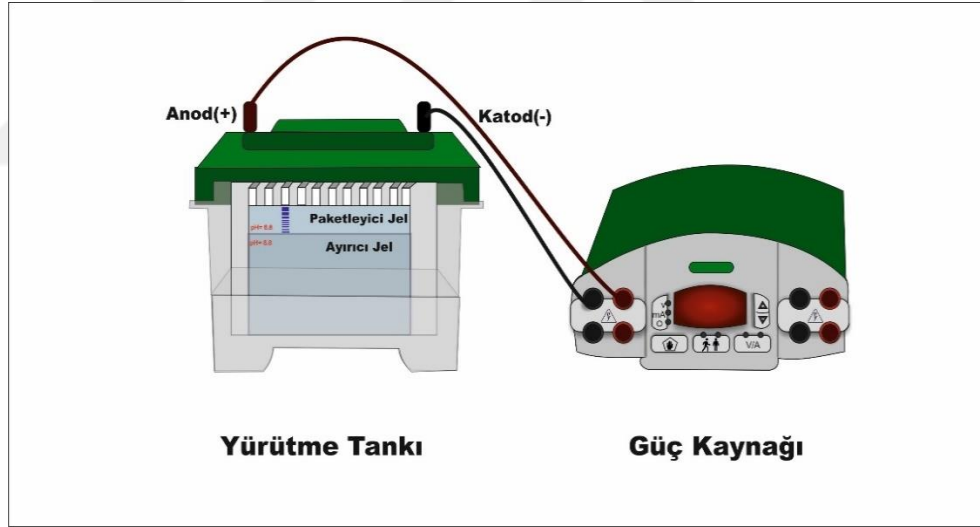
<i>Çözeltiler</i>	<i>Özellikleri</i>
<b>RIPA Liziz Tamponu pH=7,5</b>	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl %0,1 SDS
<b>Proteaz/fosfataz İnhibitörleri</b>	2 µg/mL aprotinin 5 µg/mL leupeptin 1 µg/mL pepstatin A 1 mM PMSF 10 mM NaF

Süpernatantlardaki protein konsantrasyonlarının belirlenmesi için Biçinkoninik Asit (BCA)protein analiz kiti (Thermo) kullanıldı. Yönteme göre, alkali ortamda protein tarafından  $Cu^{+2}$  iyonu  $Cu^{+1}$  iyonuna indirgenir ve BCA reaktifi ile renk değişimi gerçekleşir. 2000-25 µg/ml aralığında farklı konsantrasyonlarda sığır serum albümin (BSA) hazırlandı. Sonra, 96 kuyucuklu mikropklara 25 µl standart ve örnekler konuldu. Bir tüp içerisinde BCA A ve BCA B reaktifi 50:1 oranında karıştırıldı ve bu reaktif her kuyucuğa 200 µl olacak şekilde ilave edildi. 37 °C' de 30 dakika boyunca inkübe edildikten sonra 526 nm 'de absorbans ölçümü yapıldı. Her BSA standardına ait absorbans değerlerine karşı konsantrasyon grafiği çizildi. Standart grafikten yararlanarak bilinmeyen örneklerin bilinmeyen örneklerin total protein konsantrasyonu hesaplandı. Protein tayininden sonra, 1X Yürütme tamponu (Tablo 5) bulunan Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi ile proteinler moleküler ağırlıklarına ayrıldı. Bunun için %6'lık ayırıcı jel ve %5'lik paketleyici jeller hazırlandı (Tablo 4).

**Tablo 4.** SDS-PAGE poliakrilamid jeller

<i>Kullanılan Reaktifler</i>	<i>%6'lık Ayrıcı Jel</i>	<i>%5'lik Paketleyici Jel</i>
dH <sub>2</sub> O	2,6 ml	1.4 ml
%30 Akrilamid	1,0 ml	330 µl
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,3 ml	-
1,0 M Tris-HCl pH 6,8	-	250 µl
% 10 SDS	50 µl	20 µl
% 10 APS	50 µl	20 µl
TEMED	4 µl	2 µl

Ependorf içerisinde 25 µg protein lizatı ile 2X örnek yükleme tamponu karıştırıldı ve 95 °C'de 5 dakika boyunca denatüre edildi (Tablo 5). Bu işlemden sonra, ilk 30 dakika 90V'da, son 90 dakika 120V'de +4°C'de elektroforez yapıldı (Şekil 12).



**Şekil 12.** SDS Jel Elektroforezi

Elektroforez işleminden sonra, jeldeki proteinler poliviniliden diflorür (PVDF) membranına ıslak transfer sistemi (Biorad) ile sabit 140 mA'de +4°C'de 18 saat boyunca transfer edildi. Sonra, %5'lik yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T) bloklama çözeltisi hazırlandı ve membran ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi (Tablo 5).

Membranlar, mTOR (1:1000), AMPK (1:500) ve PARP (1:1000) primer antikorları ile 18 saat boyunca +4°C'de inkübe edildi. Ayrıca, referans gen olarak  $\alpha$ -aktinin

(1:3000) primer antikor kullanıldı. Membranlar 1X TBS-T ile 3 kere 10 dakika yıkandıktan sonra sekonder antirabbit antikorlar ile (mTOR-1:2000 / AMPK-1:1000 / PARP-1:2000 /  $\alpha$ -aktinin-1:5000) oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi. Bundan sonra yıkama işlemleri tekrar yapıldı. Membranlar UVP jel ve membran dökümantasyon cihazına yerleştirildi ve ECL çözeltisi ilave edilerek görüntüleri alındı. UVP Biomaging system with LabWorks 4.6 Image Acquisition yazılımı kullanılarak elde edilen bantların dansimetrik analizleri yapıldı. Bantların optik dansitesi (O.D/mm<sup>2</sup>) ve alanları (mm<sup>2</sup>) belirlendi. Bu verilerle, ‘alan x optik dansite’ formülü kullanılarak band yoğunluğu hesaplandı.

**Tablo 5 .** Western Blot analizinde kullanılan çözeltiler

<i>Çözeltiler</i>	<i>Özellikleri</i>
<b>1X Yürütme Tamponu pH=8.3</b>	20 mM Tris-baz 0,2 M Glisin %0,1 SDS
<b>2X Örnek Yükleme Tamponu</b>	%4 SDS % 10 b-merkaptolanol %20 gliserol %0,004 bromfenol mavisi 125 mM Tris HCl
<b>1X TBS-T</b>	10 mM Tris-HCl 1,4 M NaCl %1 Tween 20

### 3.7 Araştırma Planı ve Takvimi

Eylül 2020-Mayıs 2021	Literatür taraması
Ekim 2022	Sarf malzemelerin elde edilmesi
Ocak 2023-Nisan 2023	Çift emülsiyon yöntemi ile PLGA-PEG-MET nanopartiküllerin elde edilmesi
Şubat 2023-Mayıs 2023	FT-IR, SetazSizer ile PLGA-PEG-MET nanopartikülünün, PLGA-PEG polimerin, saf Metformin'nin ve SEM cihazı ile PLGA-PEG-MET nanopartikülünün karakterizasyonlarının yapılması
Eylül 2021-Haziran 2023	In vitro WST-1 testi ile FTC-133 hücre hattı üzerinde deney gruplarının hücre canlılığına etkisinin incelenmesi
Eylül 2021-Haziran 2023	In vitro, Koloni oluşum testi ile FTC-133 hücre hattı üzerinde sağkalıma göre uzun süreli etkisi incelenmesi
Eylül 202-Temmuz 2023	In vitro, Western Blot analizi ile FTC-133 hücre hattı üzerinde AMPK, p-AMPK, mTOR, PARP protein ekspresyonlarına bakılması
Nisan 2023 - Temmuz 2023	Deney sonuçları ile istatistiksel analizlerin yapılması
Ağustos 2022- Ağustos 2023	Yüksek Lisans Tezinin yazılması

### **3.8 Verilerin Değerlendirilmesi**

Üç grubun (saf Metformin/ PLGA-PEG Polimerleri/ PLGA-PEG-MET nanopartikülleri) hücre hattı üzerindeki etkilerinin istatistiksel analizleri Prism GraphPad 9.5.1 (San Diego, CA, USA) ile yapıldı. Çalışmalar en az 3 kere tekrar edilecektir. Elde edilen veriler, Ortalama  $\pm$  Standart Sapma şeklinde verildi. Üç veya daha çok grubun karşılaştırılmasında “One-way ANOVA with Dunnet post hoc test” veya ikili grup karşılaştırmalarında “unpaired t test” kullanılarak gruplar arası istatistiksel fark değerlendirildi. Analizlerin sonucunda anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,0001$  olarak ifade edildi.

### **3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları**

Serbest metforminin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin, *in vitro* salınımının değerlendirilmesi için diyaliz tekniği ile incelenememesi araştırmanın sınırlılıklarındandır.

### **3.10 Etik Kurul Onayı**

Etik kurul onayı, 05.04.2021 tarihli 6222-GOA dosya numarası ile Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından verilmiştir (EK-1).

## 4.BULGULAR

### 4.1 Serbest Metformini, PLGE-PEG Polimerinin ve PLGA-PEG-MET Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

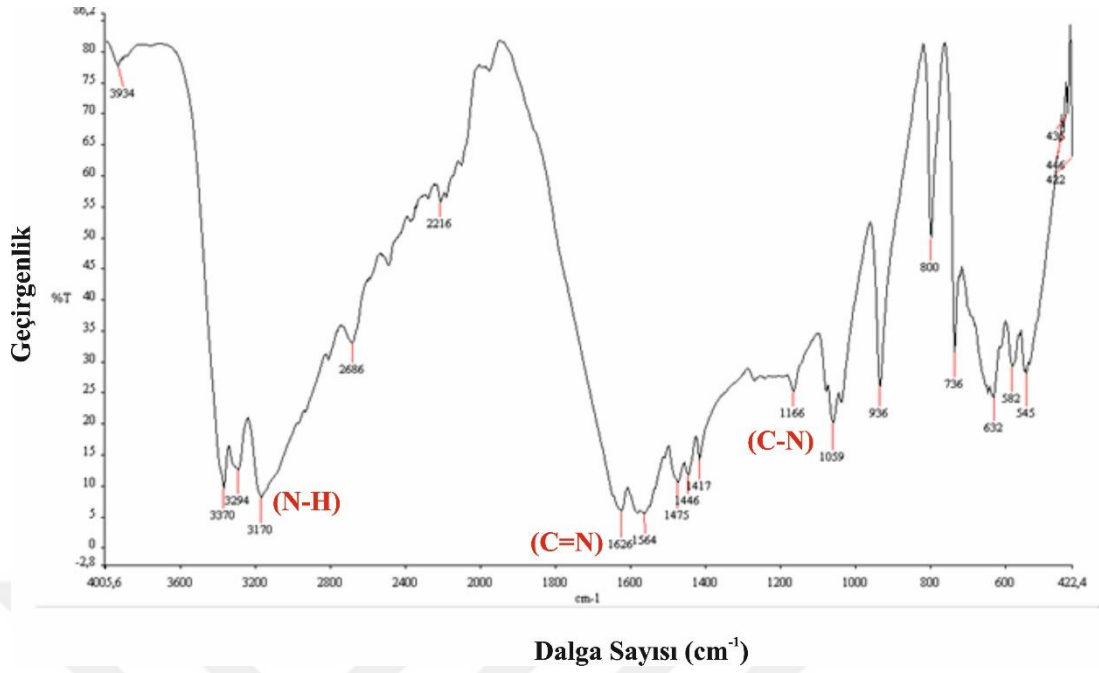
#### 4.1.1 Serbest Metforminin, PLGA-PEG Polimerinin ve PLGA-PEG-MET Nanopartiküllerinin FT-IR Cihazı ile Karakterizasyonu

FT-IR cihazı ile serbest metforminin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak bu maddelerin fonksiyonel grupları ve yapılarındaki bağlanma yerleri belirlendi. Bunun için, FT-IR matematiksel Fourier dönüşümü ile ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ( $\text{cm}^{-1}$ ) ölçmek için Spectrum v5.3.1 programı kullanıldı (118).

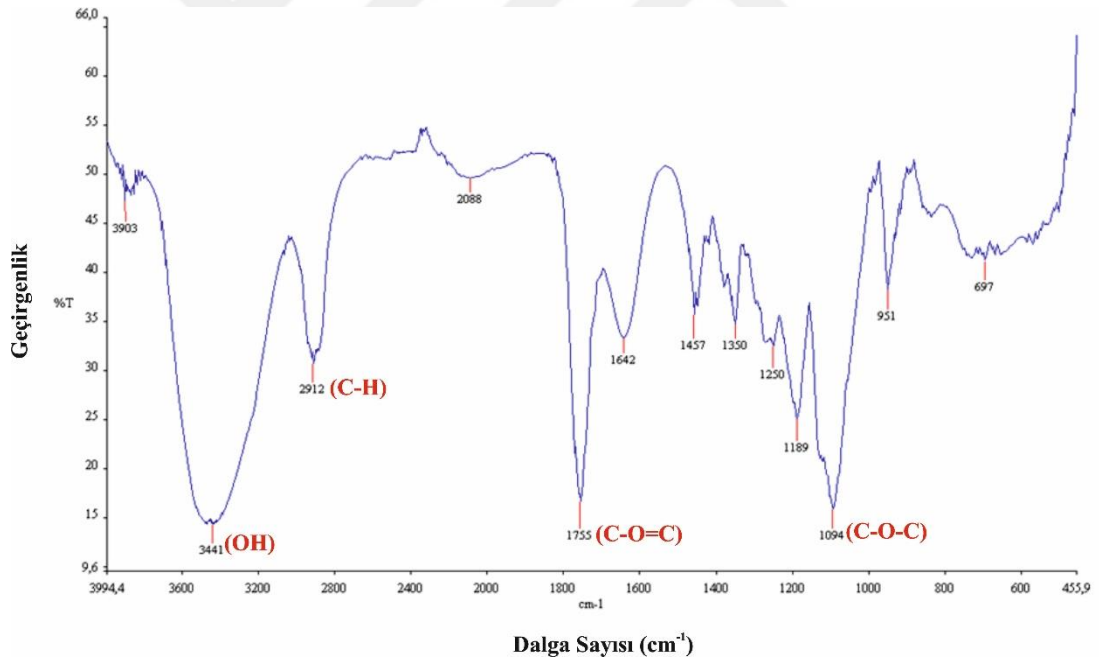
Serbest Metforminin verilerine göre (şekil 13), imin (NH) fonksiyonel grubunun asimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerinden dolayı 3370,3294 ve 3170  $\text{cm}^{-1}$  bölgelerinde orta yoğunlukta pikler gözlemlendi. Ayrıca, 1626 ve 1564  $\text{cm}^{-1}$  bölgelerinde C=N fonksiyonel grubunun gerilme titreşimleri gözlemlendi. Bunun dışında, serbest metforminde bulunan alifatik diaminin (C-N) gerilme titreşiminden kaynaklı 1166 ve 1059  $\text{cm}^{-1}$  'de zayıf pikler gözlemlendi.

PLGA-PEG polimerinin verilerine göre (şekil 14), PLGA polimerinin ester karbonil (C-O=C) grubunun pikleri 1755  $\text{cm}^{-1}$  'de gözlemlendi. Bununla birlikte, PLGA polimerinin metil ( $\text{CH}_3$ ) grubuna ait C-H bağlarına ait pikler 1457  $\text{cm}^{-1}$  'de gözlemlendi. Ayrıca, 1094  $\text{cm}^{-1}$ 'de PEG'in eterik (C-O-C) grubunun pikleri gözlemlendi. Bunun dışında, PEG'ten gelen hidroksil (OH) grubunun pikleri 3441  $\text{cm}^{-1}$ 'de ve metain (C-H) , metilen ( $\text{CH}_2$ ) grubunun bandı 2912  $\text{cm}^{-1}$  'de gözlemlendi.

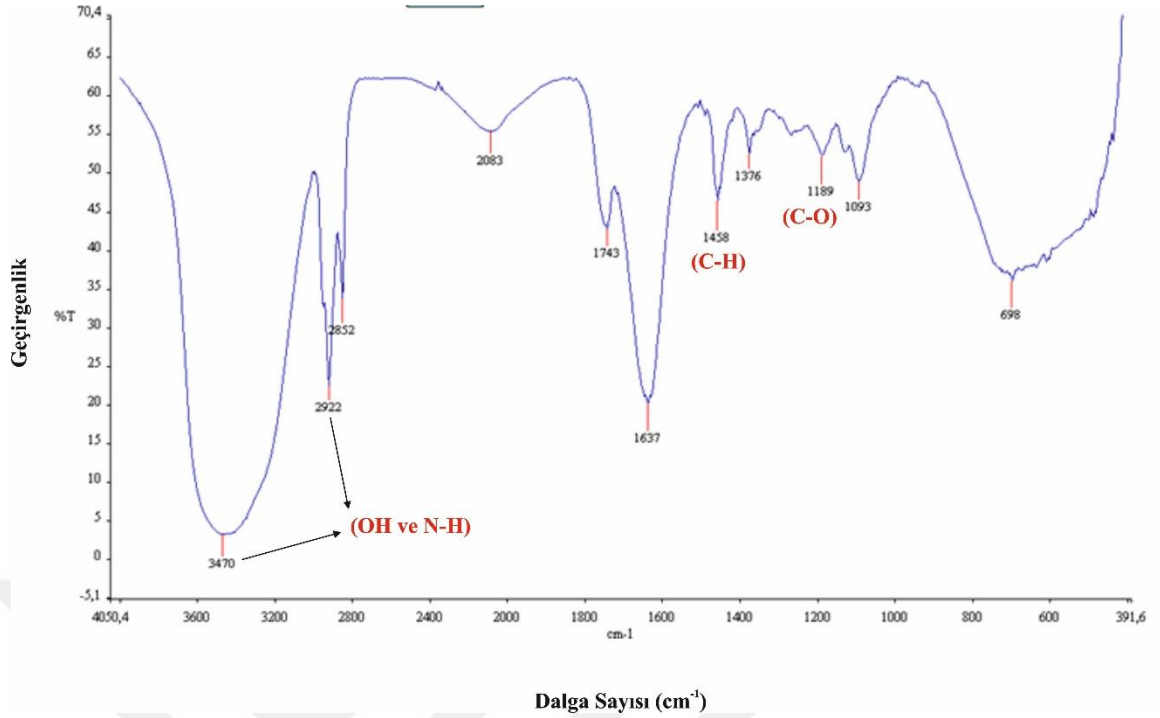
PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin verilerine göre (şekil 15), 1458  $\text{cm}^{-1}$  'de metain (C-H) fonksiyonel grubunun eğilme titreşim moduna ait pik gözlemlendi. PLGA-PEG ve metformine ait hidroksil (OH) ve imin (NH) pikleri 3470-2922  $\text{cm}^{-1}$  arasında gözlemlendi. Ayrıca, 1189 ve 1093  $\text{cm}^{-1}$  'deki piklerin C-O grubunun gerilme titreşimlerine ait olduğu gözlemlendi.



Şekil 13. Serbest metforminin FT-IR spektrumu.



Şekil 14. PLGA-PEG polimerinin FT-IR spektrumu.



**Şekil 15.** PLGA-PEG-MET nanopartikülün FT-IR spektrumu.

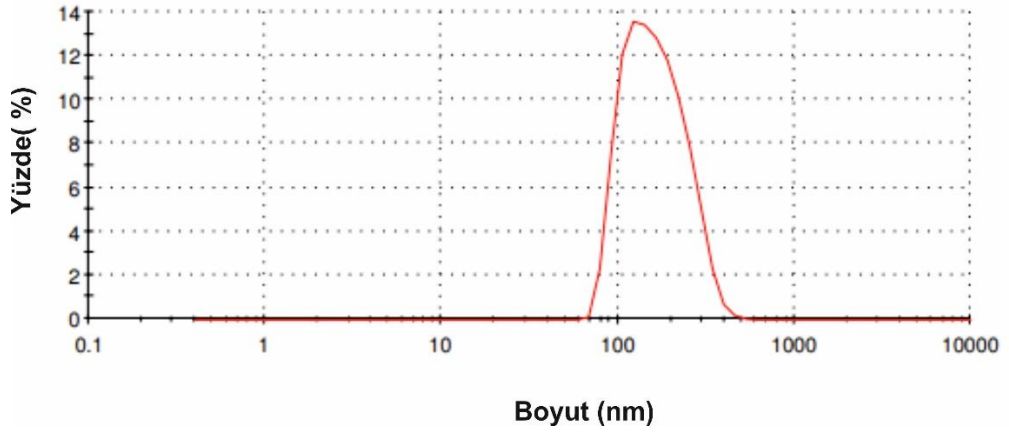
#### ***4.1.2 PLGA-PEG Polimerinin ve PLGA-PEG-MET Nanopartikülünün ZetaSizer Cihazı ile Karakterizasyonu***

PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin ortalama boyutu (çap,nm),polidispersite indeksi (PDİ) ve yüzey yükü (zeta potansiyel, mv), Malvern Nano ZS cihazı kullanılarak dinamik ışık saçılımı (DIS) metodu ile belirlendi.

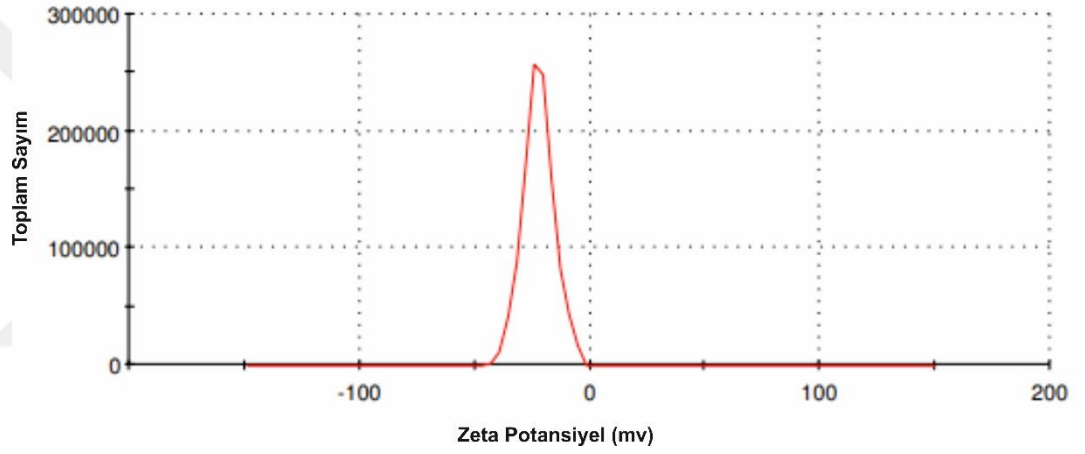
PLGA-PEG polimerinin boyutu 269,4 nm, polidispersite indeksi 0,391 ve zeta potansiyeli  $-0,552 \text{ mv} \pm 5,32$  olarak bulundu (tablo 6).

PLGA-PEG-MET nanopartikülünün boyutu (şekil 16) (tablo 6) 217,6 nm ve polidispersite indeksi (PDİ) 0,237 olarak bulundu.

PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin zeta potansiyeli (şekil 17) (tablo 6)  $-22,4 \pm 6,79 \text{ mv}$  olarak bulundu.



**Şekil 16.** PLGA-PEG-MET nanopartikülünün dinamik ışık saçılımı metodu ile boyut analizi.



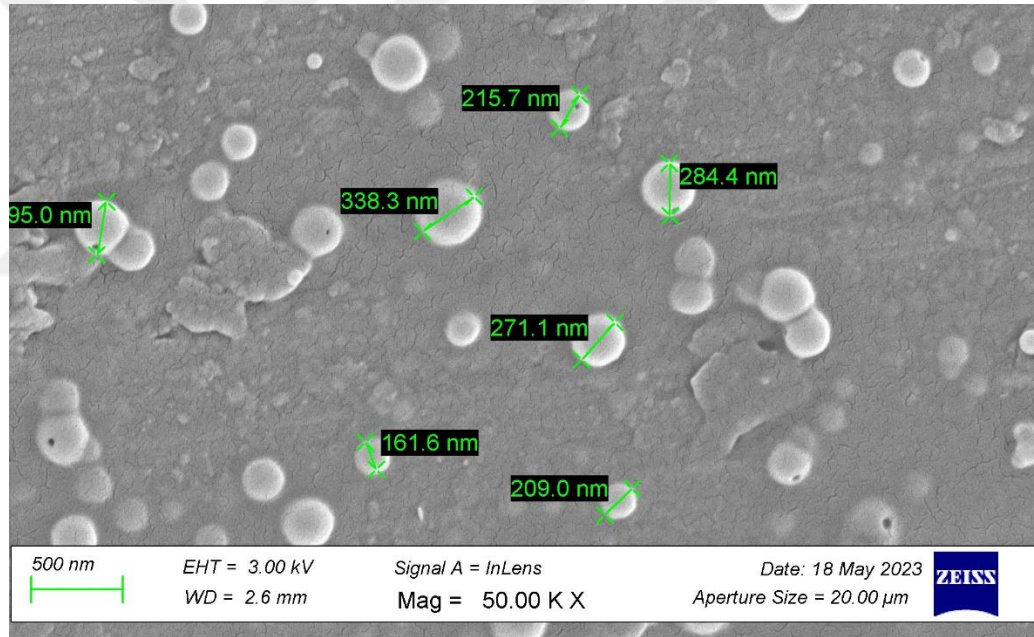
**Şekil 17.** PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin dinamik ışık saçılımı metodu ile zeta potansiyel dağılım analizi.

**Tablo 6.** PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin boyut (nm), polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel (mv) dağılım ölçümü (n=3).

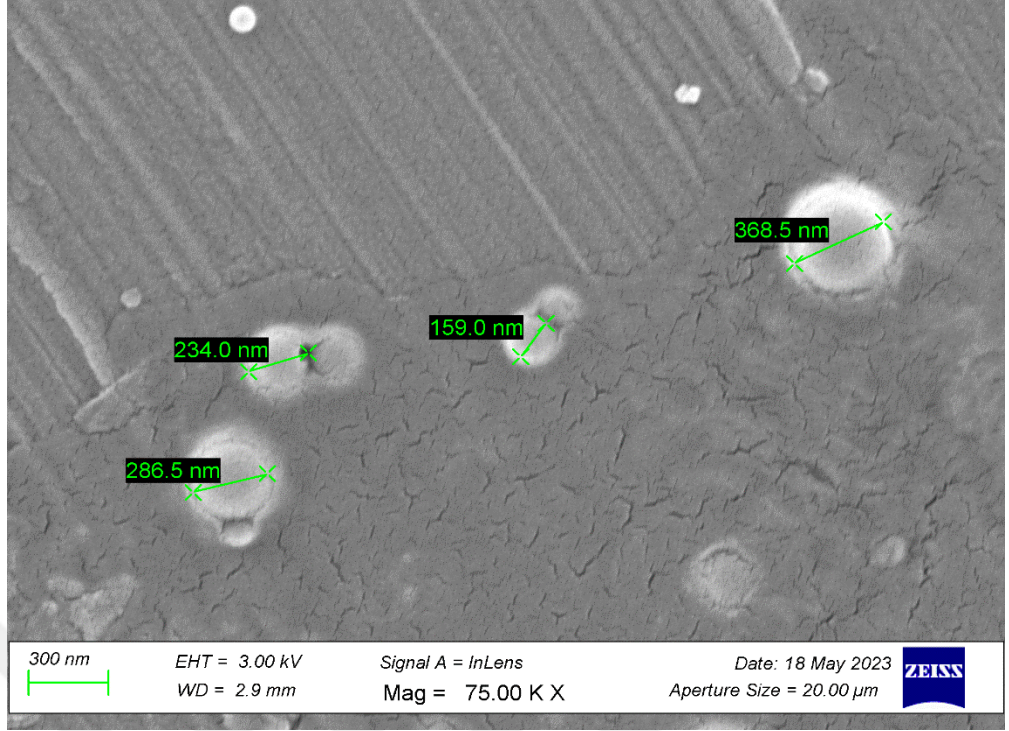
Grup	Boyut (nm)	Polidispersite İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mv)
PLGA-PEG Polimeri	269,4	0,391	-0,552±5,32
PLGA-PEG-MET Nanopartikülü	217,6	0,237	-22,4±6,79

#### 4.1.3 PLGA-PEG-MET Nanopartikülünün SEM cihazı ile karakterizasyonu

PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin yüzey morfolojisinin incelenmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanıldı (şekil 18-19).



**Şekil 18.** SEM cihazı ile 500 nm ölçeğinde PLGA-PEG-MET nanopartikülünün morfolojisi.



**Şekil 19.**SEM cihazı ile 300 nm ölçeğinde PLGA-PEG-MET nanopartikülünün morfolojisi.

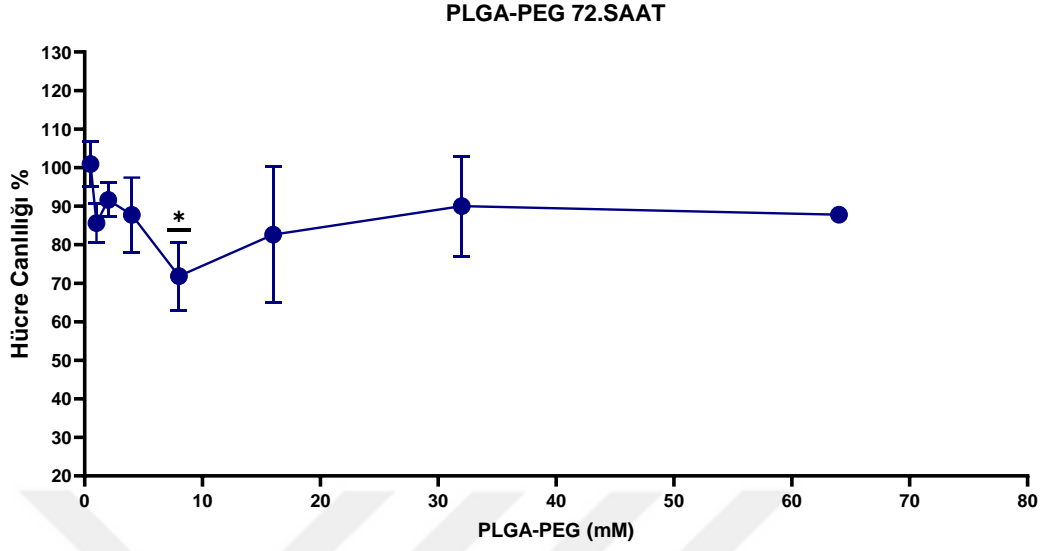
#### **4.2 WST-1 Testi ile Serbest Metforminin, PLGA-PEG Polimerinin ve PLGA-PEG-MET Nanopartiküllerinin Hücre Canlılığı üzerinde Etkileri**

Serbest metforminin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin FTC-133 hücre hattı üzerindeki etkileri WST-1 canlılık testi ile incelendi. 96 kuyucuklu mikropatlara 5000 hücre ekildikten sonra serbest metforminin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin (0,5-64 mM) dozları verildi. Üç grubun, FTC-133 hücre hattı üzerinde etkileri 72 saat boyunca gözlemlendi.

WST-1 canlılık testine göre, PLGA-PEG polimeri için doza bağılı olarak hücre canlılığında azalma meydana gelmemiştir. 72. saat için PLGA-PEG polimerinin hücre canlılığını inhibe eden  $IC_{50}$  değeri 785 mM olarak hesaplandı (Şekil 20).

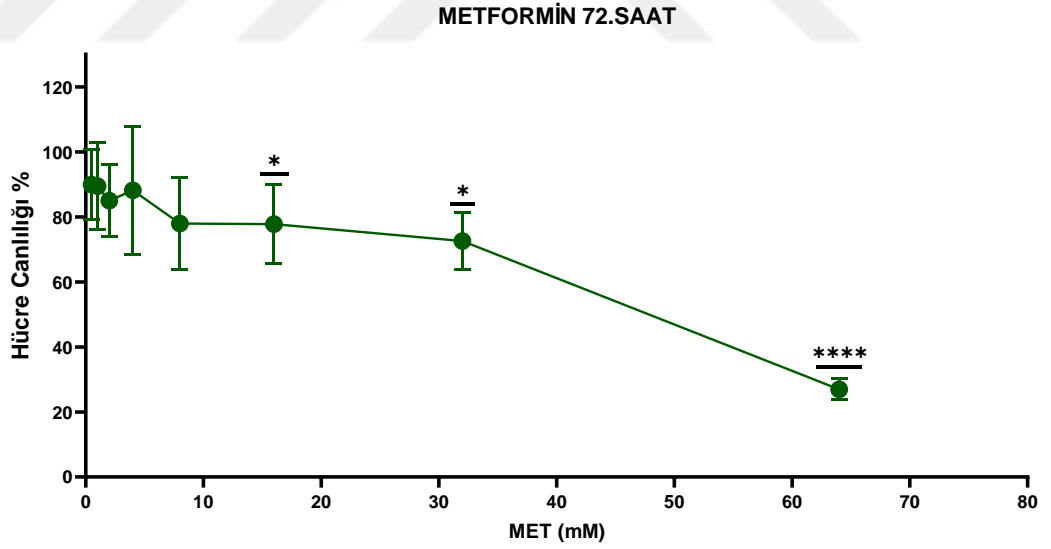
Serbest metforminin doza bağılı olarak hücre canlılığında azalmaya neden olmuştur. 72. saat için serbest metforminin hücre canlılığını inhibe eden  $IC_{50}$  değeri 38.2 mM olarak hesaplandı (Şekil 21).

PLGA-PEG-MET nanopartikülleri için doza bağılı olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. 72. saat için PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin hücre canlılığını inhibe eden  $IC_{50}$  değeri 31.9 mM olarak hesaplandı (Şekil 22).



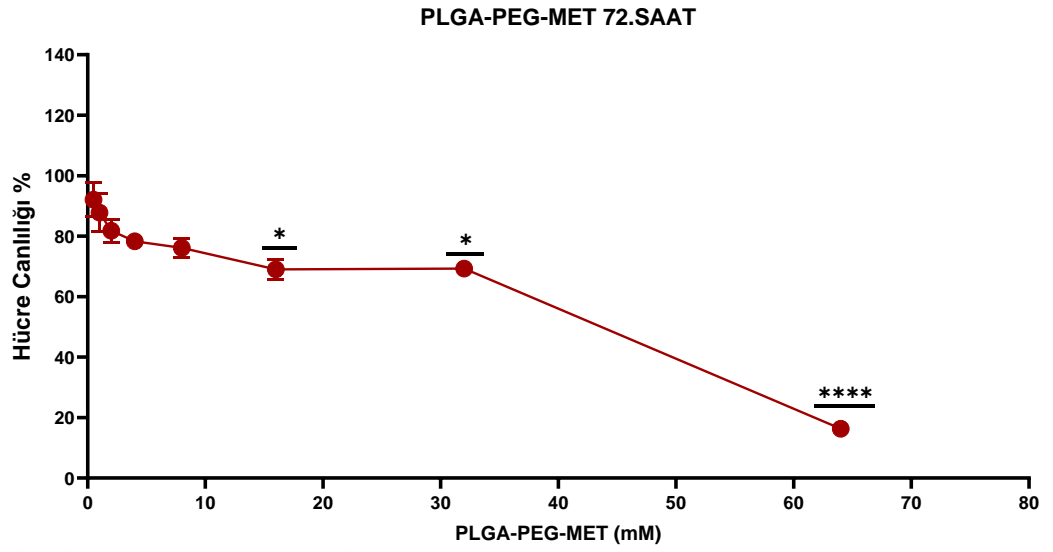
**Şekil 20.** FTC-133 hücre hattı üzerinde (0,5-64 mM) PLGA-PEG polimerinin 72. saat boyunca etkisi (n=3). Veriler ortalama± SEM olarak ifade edildi.

\*p<0,05



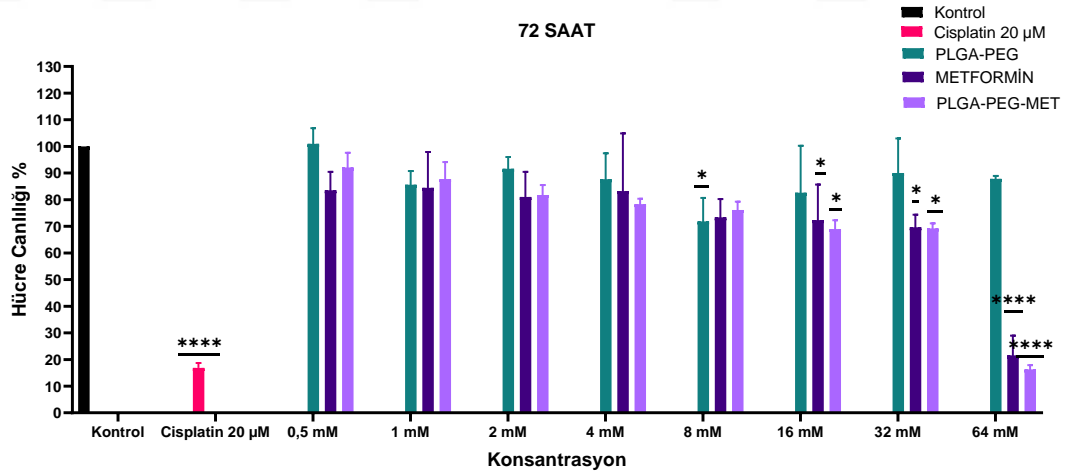
**Şekil 21.** FTC-133 hücre hattı üzerinde (0,5-64 mM) serbest metforminin 72. saat boyunca etkisi (n=3). Veriler ortalama± SEM olarak ifade edildi.

\*p<0,05; \*\*\*\*p<0,0001



**Şekil 22.** FTC-133 hücre hattı üzerinde (0,5-64 mM) PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin 72. saat boyunca etkisi (n=3). Veriler ortalama± SEM olarak ifade edildi.

\*p<0,05; \*\*\*\*p<0,0001



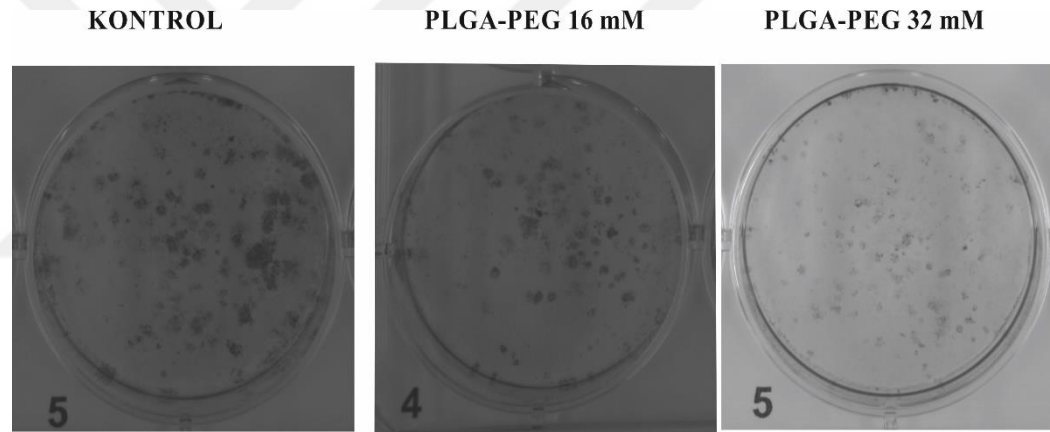
**Şekil 23.** 72 saat boyunca, FTC-133 hücre hattında cisplatinin, PLGA-PEG polimerinin, metforminin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin etkileri. Veriler ortalama± SEM olarak ifade edildi.

\*p<0,05; \*\*\*\*p<0,0001

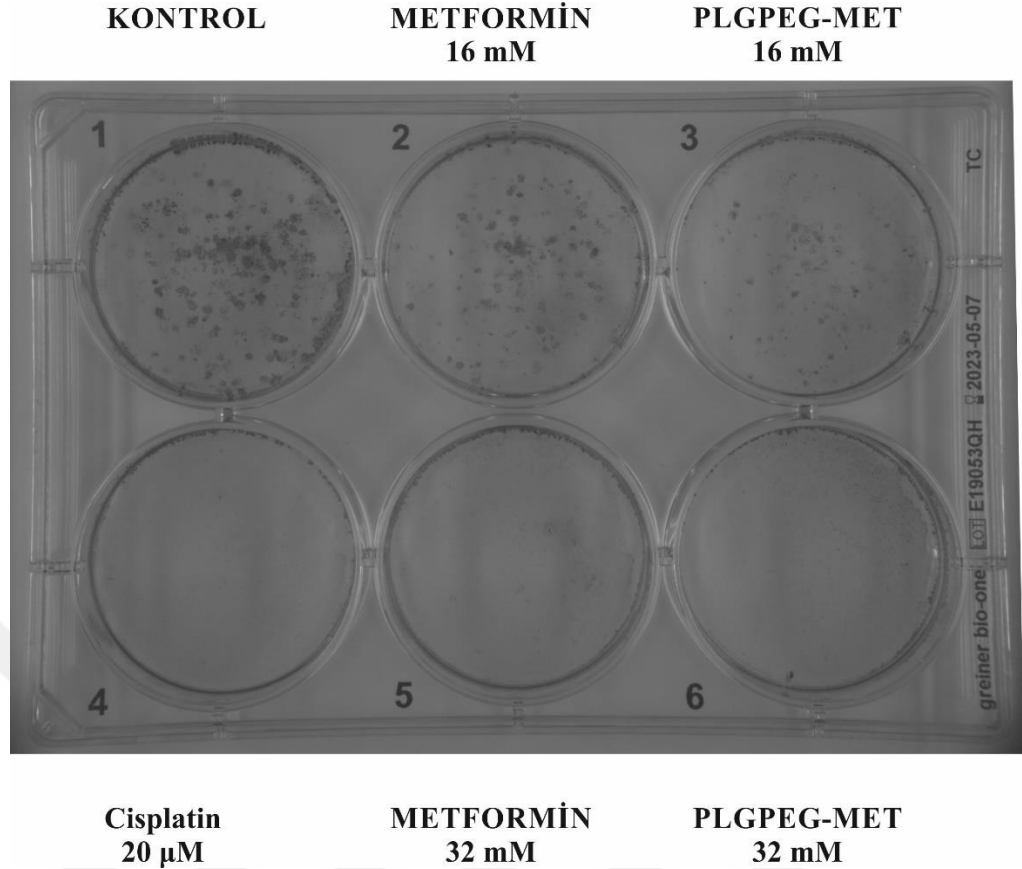
#### 4.3 Koloni Oluşum Testi ile Serbest Metforminin, Cisplatinin, PLGA-PEG Polimerinin ve PLGA-PEG-MET Nanopartiküllerinin Hücre Canlılığı üzerinde Etkileri

Serbest metforminin, cisplatinin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin klonojenik sağ kalım üzerindeki etkisi FTC-133 hücre hattı üzerinde koloni oluşum testi ile incelenmiştir. Hücreler 8 gün boyunca incelendikten sonra fikse edilip boyandı ve UVP jel dökümantasyon cihazı ile koloni görüntüleri elde edildi.

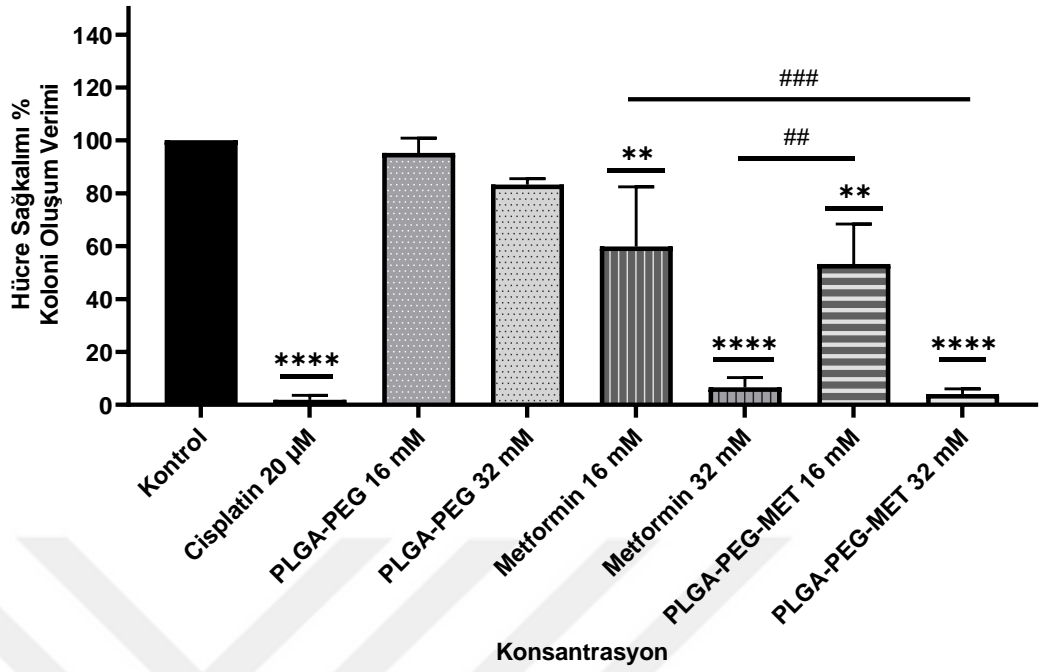
PLGA-PEG polimerinin FTC-133 hücre hattı üzerinde koloni oluşturma kapasitesini etkilemediği görüldü. Fakat PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin, cisplatinin ve serbest metforminin dozlarla bağlı olarak FTC-133 hücrelerinde koloni oluşturma kapasitesinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. (Şekil 26,27,28).



**Şekil 24.** 8 gün boyunca PLGA-PEG polimeri uygulaması sonrası FTC-133 hücrelerinin koloni görüntüsü.



**Şekil 25.** 8 gün boyunca Cisplatin, serbest metformin ve PLGA-PEG nanopartikülü uygulaması sonrası FTC-133 hücrelerinin koloni görüntüsü.



**Şekil 26.** Serbest metforminin, Cisplatinin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin FTC-133 hücrelerinde koloni oluşum verimi (CFE). Veriler ortalama± SEM olarak ifade edildi.

\*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001

##p :0,0017; ###p: 0,003

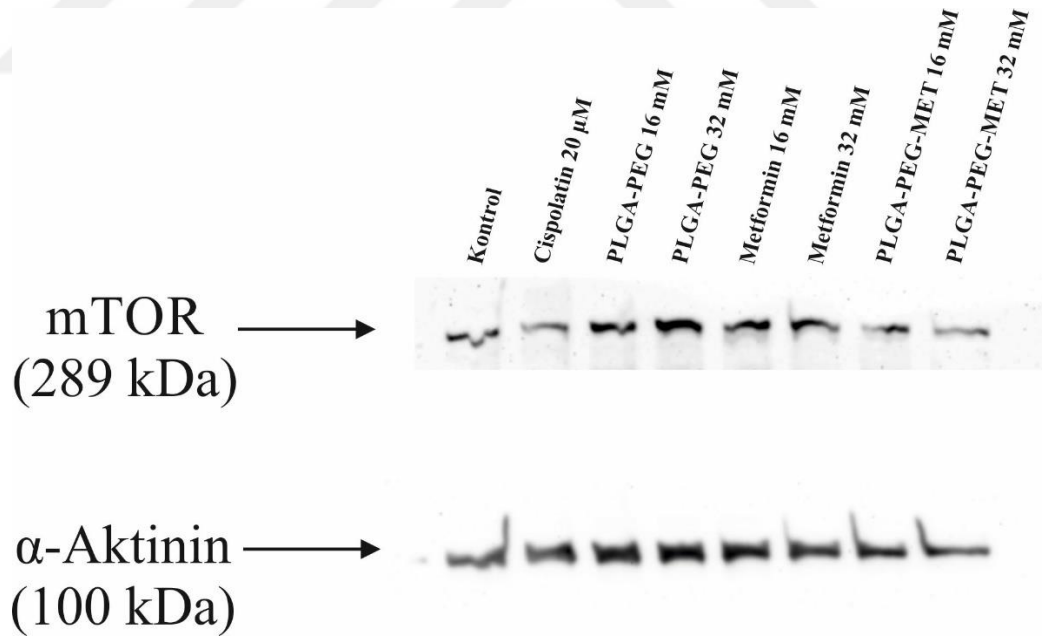
#### 4.4 Serbest Metforminin, Cisplatinin, PLGA-PEG Polimerinin ve PLGA-PEG-MET Nanopartiküllerinin mTOR, AMPK, p-AMPK ve PARP Protein Ekspresyonları Üzerinde Etkisi

72 saat sürecinde serbest metformin, cisplatin, PLGA-PEG polimeri ve PLGA-PEG-MET nanopartikülleri FTC-133 hücre hattı üzerinde uygulandıktan sonra mTOR, AMPK, p-AMPK ve PARP protein ekspresyon düzeylerine bakıldı. UVP Biomaging system with LabWorks 4.6 Image Acquisition yazılımı ile verilerin bantlarında dansimetrik analizleri yapıldı. Bununla birlikte grupların protein ekspresyon düzeyleri iç kontrolü  $\alpha$ -aktinin protein ekspresyon düzeylerine oranlandı.

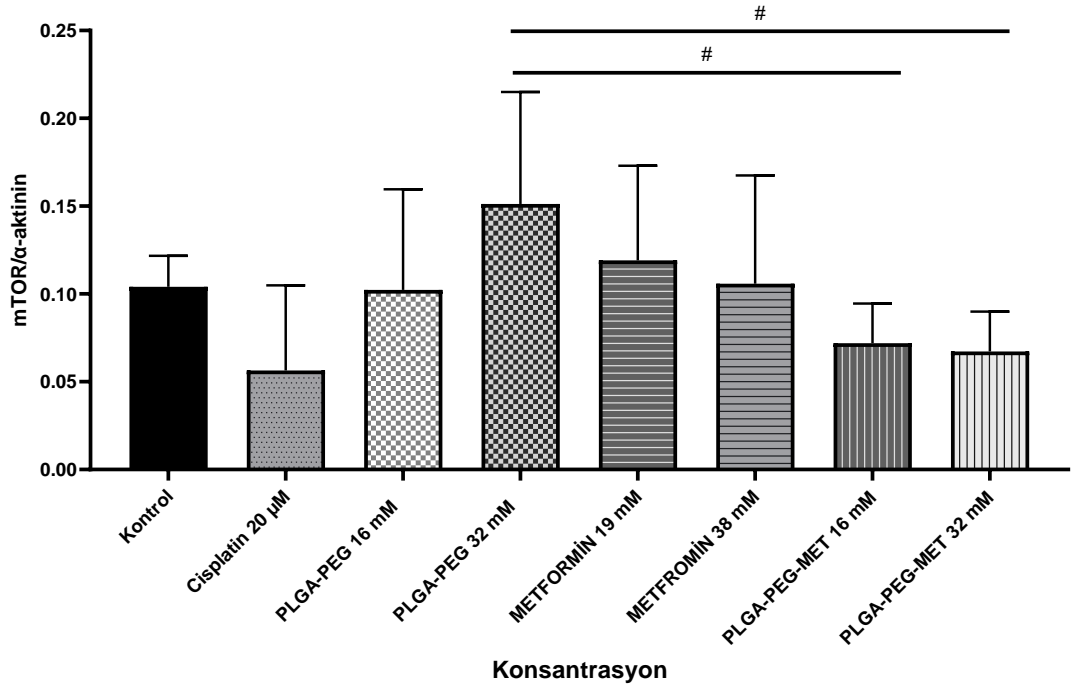
##### 4.4.1 mTOR Protein Ekspresyonu

Western blot analizlerine göre, FTC-133 hücre hattı üzerinde mTOR ekspresyon düzeylerinin 16 mM ve 32 mM PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin ( $p=0,0498$  ve  $p=0,0379$ ), 32 mM PLGA-PEG polimerine göre karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (Şekil 29).

A)



B)

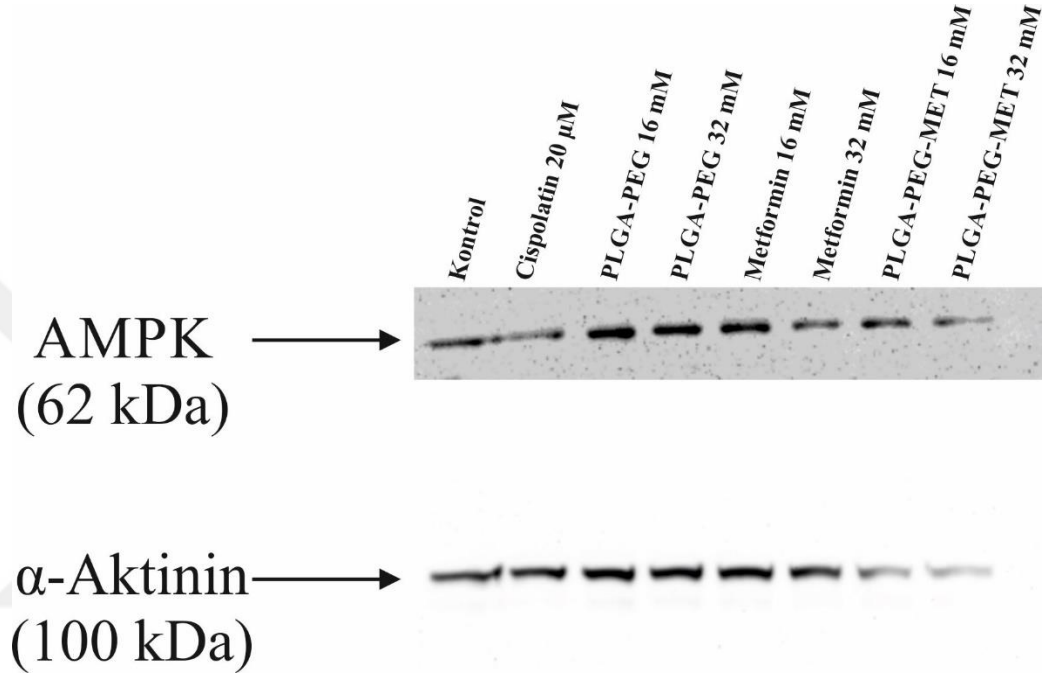


**Şekil 27.**FTC-133 hücre hattı üzerinde serbest metforminin, cisplatinin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin mTOR protein ekspresyonları üzerinde etkisi . # p<0,05

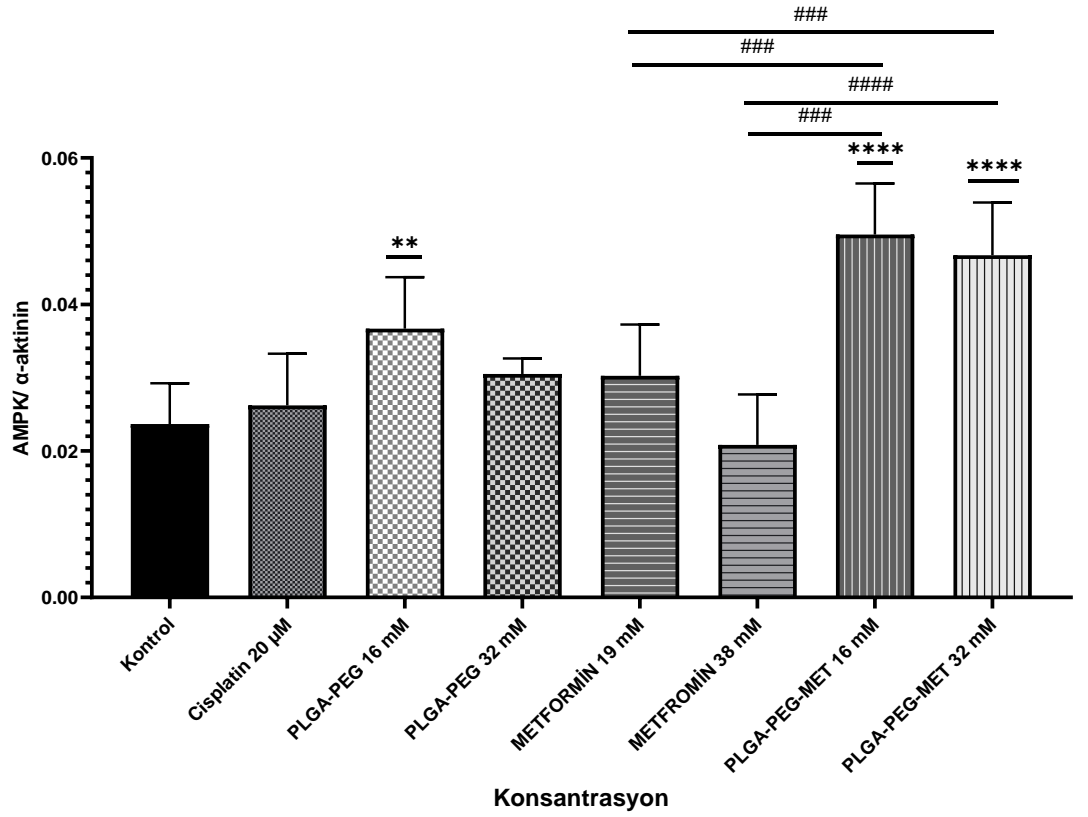
#### 4.4.2 AMPK Protein Ekspresyonu

Western blot analizlerine göre, 16 Mm ve 32 mM dozda PLGA-PEG-MET nanopartikülleri ile muamele edilen FTC-133 hücrelerinde AMPK ekspresyon düzeylerinin kontrole göre anlamlı olarak arttığı görüldü (Şekil 26).

A)



B)

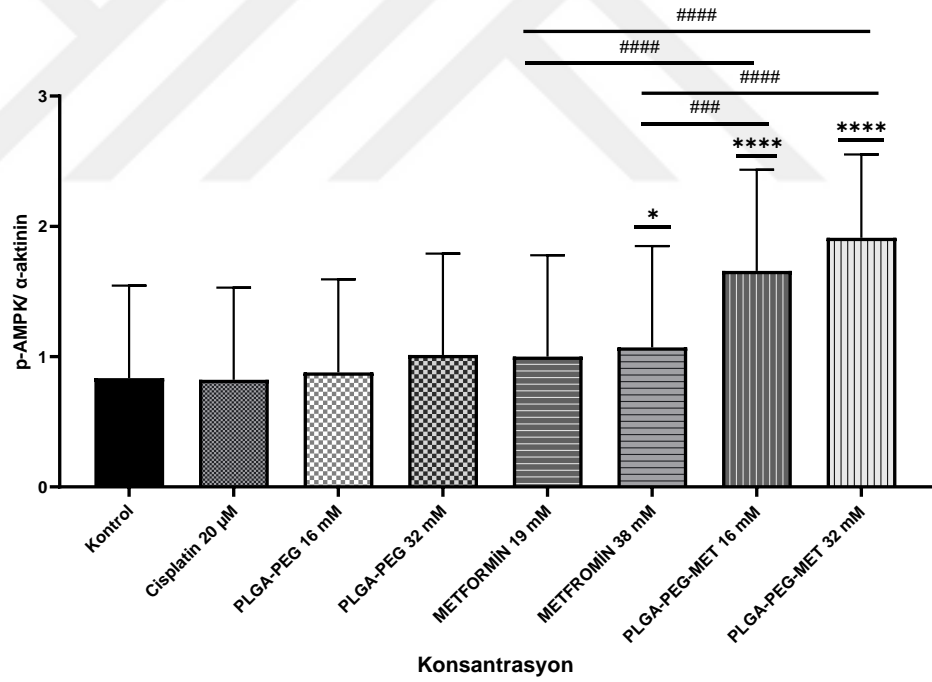
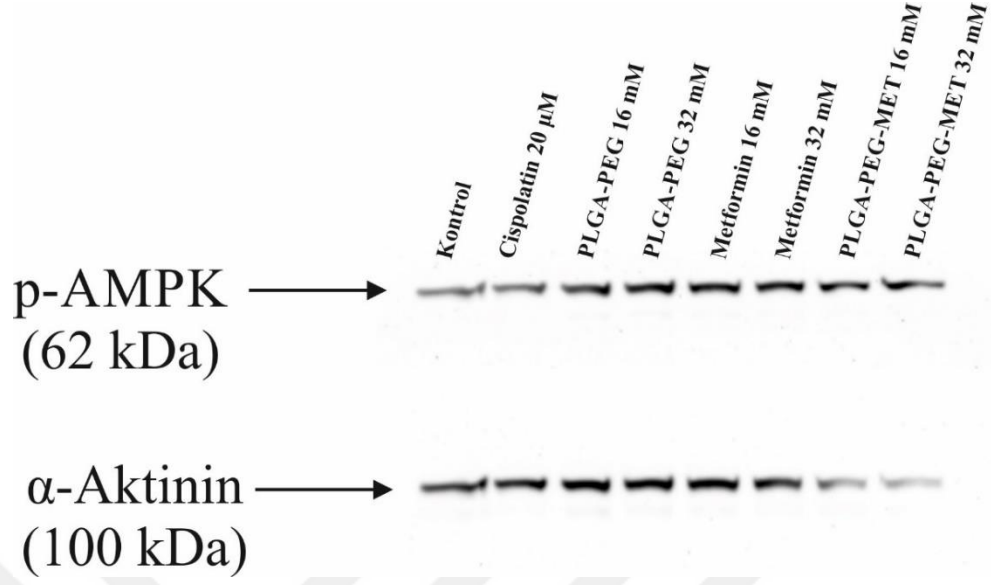


**Şekil 28.** FTC-133 hücre hattı üzerinde serbest metforminin, cisplatinin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin AMPK protein ekspresyonları üzerinde etkisi. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ### $p < 0,001$ ; #### $p < 0,0001$

#### 4.4.3 p-AMPK Protein Ekspresyonu

FTC-133 hücrelerinde p-AMPK ekspresyon düzeyleri kontrole göre 38 mM metforminde ( $p=0,0238$ ), 16 ve 32 mM PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinde anlamlı olarak arttığı görüldü.

A)



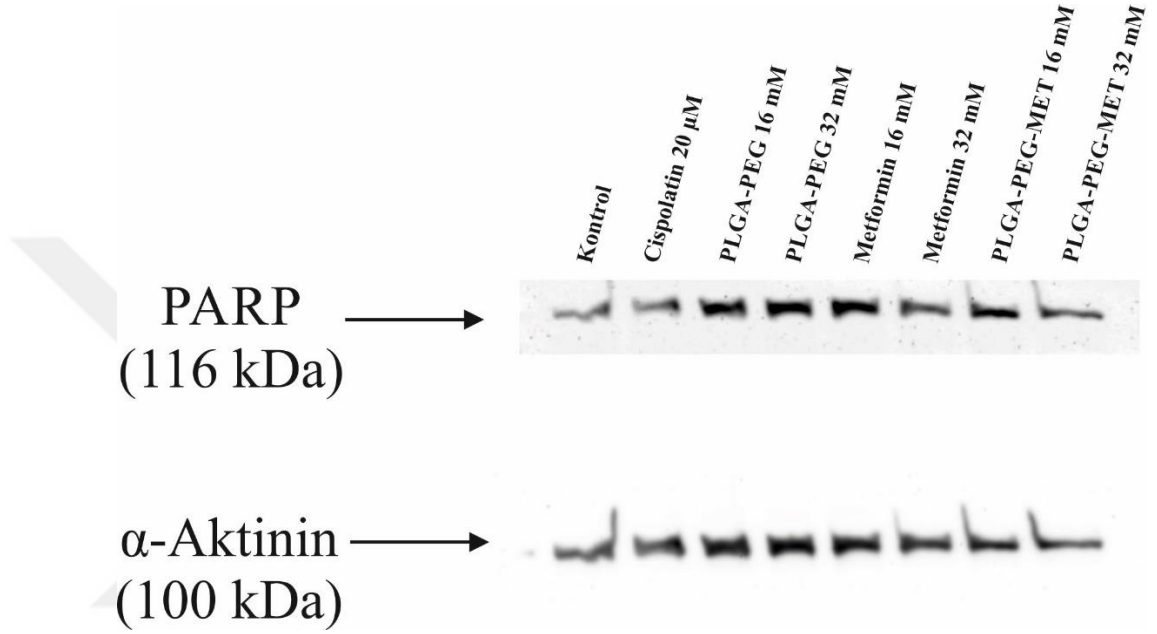
B)

**Şekil 29.** FTC-133 hücre hattı üzerinde serbest metforminin, cisplatinin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin p-AMPK protein ekspresyonları üzerinde etkisi (n=3). \*p<0,05;\*\*\*\*p<0,0001;###p<0,001;####p<0,0001

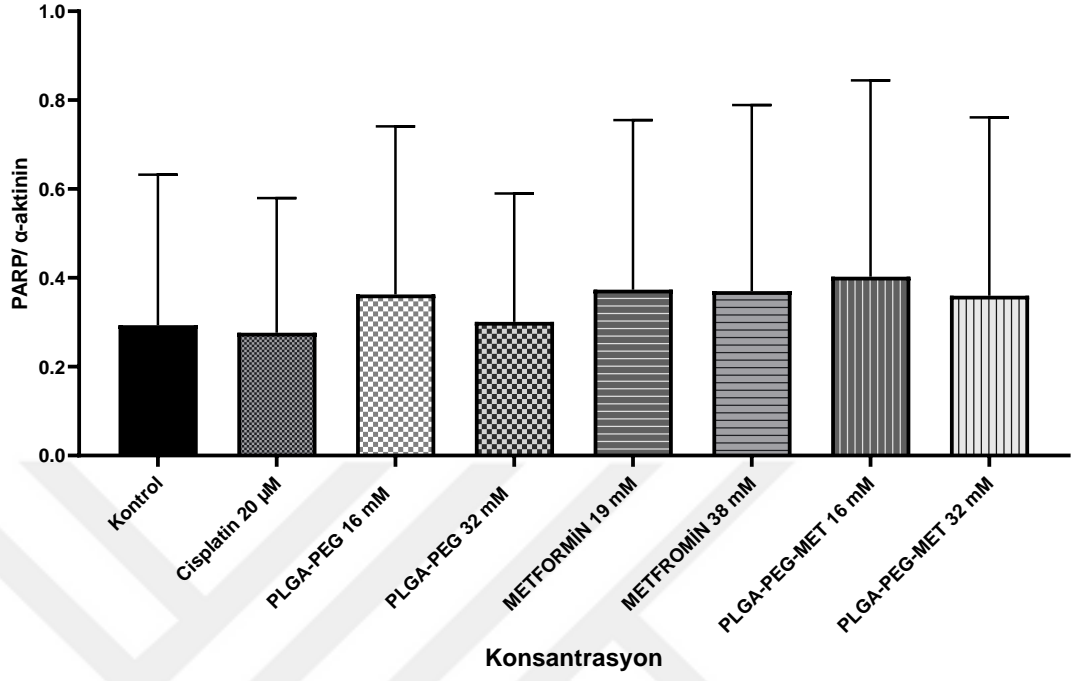
#### 4.4.4 PARP Protein Ekspresyonu

FTC-133 hücre hattı üzerinde serbest metforminin, cisplatinin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin PARP ekspresyonunda kontrole göre anlamlı bir fark belirlenemedi (şekil 32).

A)



B)



**Şekil 30.** FTC-133 hücre hattı üzerinde serbest metforminin, cisplatinin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin PARP protein ekspresyonları üzerinde etkisi (Ortalama± Standart hata).

## 5.TARTIŞMA

Tiroid kanseri, dünya genelinde artan bir insidansa sahip ve en yaygın endokrin malignite olan 9.kanser türüdür (119). Tiroid kanseri için kullanılan tedavi yöntemleri; cerrahi, radyoiyot, radyoterapi ve kemoterapidir (8,79). Fakat kullanılan bu tedavilerde bazı zorluklar vardır. Örneğin; radyoiyot (I-131) tedavisi uygulanan diferansiye tiroid kanseri (DTK) hastalarının çoğunda radyoiyodine karşı direnç ile karşılaşmıştır. Bu yüzden radyoiyot tedavisi etkisiz hale gelir ve sağ kalım oranı %10'dur (120).Buna ilaveten sistematik bir tedavi yöntemi olan kemoterapinin zararlı yan etkileri vardır ve tedavi de kullanılan ilaçlar toksisiteye neden olabilir (121,122). Bu gibi tedavilerin olumsuz yan etkilerini azaltmak için yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Nanopartiküler ilaç dağıtım sistemleri, tiroid kanserinde tedavi ve biyobelirteç olarak kullanılırlar. Nanopartiküller, 10-1000 nm boyut aralığındadır ve tümör bölgelerini hedeflerler. Nanopartiküler ilaç dağıtım sistemlerinde polimerik nanopartiküller, karbon nanotüpleri, lipozomal nanopartiküller gibi sistemler tiroid kanseri tedavisinde kullanılır (123).

Bu çalışmada, mikrodalga ışına kullanılarak çift emülsiyon yöntemi ile metformin yüklü, polimerik PEGillenmiş PLGA (PLGA-PEG-MET) nanopartiküller sentezlendi. PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin, PLGA-PEG polimerlerinin, serbest metforminin kimyasal ve nanoboyut özellikleri FT-IR, SetaSizer ve SEM cihazları kullanılarak belirlendi. In *vitro* ortamda, foliküler tiroid kanseri hücre hattı (FTC-133) üzerinde uygulanan deneylerde ise WST-1 analizi kullanılarak PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin, PLGA-PEG polimerlerinin, serbest metforminin hücre canlılığına olan etkileri; koloni oluşum analizi kullanılarak etkilenen hücrelerin koloni oluşturma kapasiteleri belirlendi. Western Blot tekniği aracılığıyla PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin, PLGA-PEG polimerlerinin, serbest metforminin, mitokondriyel enerji metabolizmasında yer alan AMPK, p-AMPK, mTOR protein ekspresyonları ve apoptoz mekanizmasında yer alan PARP protein ekspresyonları üzerindeki etkileri belirlendi.

Çift emülsiyon yöntem ile sentezlenen PLGA-PEG-MET nanopartiküllerindeki PLGA-PEG polimerleri, biyolojik olarak parçalanabilen kopolimerlerdir ve serbest ilaçların absorpsiyon sorunlarını gidermek için kanser tedavilerinde kullanılırlar [108]. Bu çalışmada mikrodalga ışına kullanılarak halka

açma polimerizasyonu metoduyla sentezlenen PLGA-PEG kopolimerinin FT-IR sonuçlarına göre, PLGA'nın ester karbonil (O-C=O) grubuna ait piki 1755 cm<sup>-1</sup>'de, PEG'in eterik (C-O-C) grubuna ait pikler 1094 cm<sup>-1</sup>'de, PEG'ten gelen hidroksil (OH) ve metain (C-H) gruplarına ait pikler 2912 cm<sup>-1</sup>'de gözlemlendi. PLGA-PEG kopolimeri için FT-IR analizinde elde ettiğimiz veriler, Ghandforoushan ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile örtüşmektedir. Onların verilerine göre PLGA-PEG ester karbonil grubuna ait pik 1729 cm<sup>-1</sup>'de ve PEG'in eterik (C-O-C) grubuna ait pik 1094 cm<sup>-1</sup>'de gözlemlenmiştir (124). Preira ve arkadaşlarının elde ettiği verilere göre, PLGA polimerinin metil (CH<sub>3</sub>) grubuna ait C-H bağlarına ait pikler 1452 cm<sup>-1</sup>'de gözlemlenmiştir (125). Ayrıca, çift emülsiyon yöntemi ile sentezlenen PLGA-PEG-MET nanopartiküllerin FT-IR verilerine göre 1458 cm<sup>-1</sup>'de metil (C-H) fonksiyonel grubunun eğilme titreşim moduna ait pik ve PLGA-PEG ve metformine ait hidroksil (OH) ve imin (NH) pikleri 3470-2922 cm<sup>-1</sup> arasında gözlemlendi. Faramazi ve arkadaşlarının elde ettiği verile göre de 1448-1475 cm<sup>-1</sup> bölgesi arasında metil (C-H) grubuna ait pik ve PLGA-PEG ve metformine ait hidroksil (OH) ve imin (NH) pikleri 3300-3600 cm<sup>-1</sup> arasında bulunmuştur. Bu verilere göre bulduğumuz sonuçlar eşleşmektedir (114).

ZetaSizer cihazı ile PLGA-PEG polimeri ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin boyutu (nm), polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli (mv) hesaplanmıştır. PLGA-PEG polimerinin boyutu 269,4 nm, polidispersite indeksi 0,391 ve zeta potansiyeli -0,552 mv±5,32 olarak bulunmuştur. PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin boyutu 217,6 nm, polidispersite indeksi 0,237 ve zeta potansiyeli -22,4±6,79 mv olarak bulundu. Elde ettiğimiz veriler birçok makale ile uyumaktadır (Tablo 7).

**Tablo 7.** Farklı makalelere ait boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel sonuçları

Grup	Boyut (nm)	Polidispersite İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mv)	Referans
PLGA-PEG	205 ± 7.23	0.169	-7.2 ± 0.05	(113)
Polimeri	210	0.145	-26.5 ± 5.4	(114)
	176	0.147	-29.6 ± 2.1	(126)

	210.1± 11.7	0.392± 0.049	-18.5±0.37	(127)
PLGA-PEG-	206 ± 9.37	0.153	-6.1 ± 0.40	(113)
MET	250	0.105	-24.9 ± 4.5	(114)
Nanopartikülleri	242	0.133	-33.6 ± 3.5	(126)

300 nm'den büyük olan parçacıklar, retiküloendotel (RES) sistem tarafından bulunabilir ve kan dolaşımı yolu ile uzaklaştırılabilir. Bu yüzden, ilacın etkinliğini arttırmak için nanopartiküllerin boyutları küçük ve uygun yapıda olmalıdır (126). Bu yüzden Nanopartiküllerin boyutu da ilacın verimliliği için önemli bir faktördür. Küçük boyutlu nanopartiküller, elektrik alanında yüksek göç hızına sahiptir ve bu yüzden, nanopartiküllerin stabilitesi artar (114).

Parçacık boyutunun dağılımı, polidispersite indeksi (PDI) ile ifade edilir (127). Polidispersite indeksi, bir model içinde popülasyonların büyüklüklerine göre dağılımını gösterir. İlaç taşıma sistemlerinde, 0,3 ve altı değerler polidispersite indeksi için kabul edilebilir değerlerdir (128). Zambito ve arkadaşlarının, tümör ile ilişkili makrofajlar (TAM) için geliştirdiği PLGA-PEG-mannoz nanopartiküllerinin polidispersite indeksini 0.22 olarak bulunmuştur. Ayrıca, PLGA-PEG mannoz nanopartiküllerinin toksik olmadığı ve makrofajlardan tarafından alındığı belirlenmiştir (129).

Nanopartiküllerin zeta potansiyeli bir çözeltideki partiküllerin yüzey yükünü gösterir. Partiküller arasındaki yüklerin itme ve çekme düzeyini ölçer. Daha yüksek zeta potansiyeline sahip daha küçük partiküller, iyi partikül stabilitesi ve agregasyona karşı dirençlilik gösterir. Daha önceki çalışmalara göre, -25 mV ve +25 mV arasındaki zeta potansiyellere sahip nanopartiküllerin yüksek partikül stabilitesine sahip oldukları gösterilmiştir (130). Nanopartiküllerin yüzey yükü, nanopartiküllerin stabilitesi ve hücre zarı ile etkileşimi açısından önemlidir (114). Shao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, -30 mV ve + 40 mV aralığında değişen poli-3-hidroksibutirato-3-hidroksiheksanoat (PHBHHx) biyopolimerleri geliştirildi. Termodinamik stabiliteye bakıldığında negatif yüklü polimer içeren nanopartiküllerin pozitif yüklülere göre daha fazla kinetik stabiliteye sahip olduğu belirlendi (131). Nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan negatif yüklü ve hidrofilik yapı da olan PEG bileşiği ilacın etkinliğini artırabilir (132). Ayrıca, PLGA'da

bulunan karboksil gruplarında hidrojen iyonlarının ayrışması zeta potansiyelin negatif olmasına neden olur (113). Yapılan araştırmalarda, nanopartiküllerin serum proteinlerine tutunmaya direndiği ve vücut içerisinde daha fazla dolaşım ömrüne sahip olduğu bulunmuştur (130). 2022 yılında bir makalede, PLGA-PEG-FeO<sub>3</sub>, metformin (MET) ve silibinin (SIL) ile kombine edildi. Yapılan DLS analizlerinde, PLGA-PEG-FeO<sub>3</sub> nanopartiküllerinin zeta potansiyeli  $-23.4 \pm 3.6$  mV bulunmuştur. Bu veriler doğrultusunda, daha yüksek zeta potansiyeline sahip nanopartiküller, negatif itmeyi arttırarak doğal kolloidal yapıya ve stabilitenin uzamasına sebep olur (133).

Bu çalışmada serbest metforminin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin FTC-133 hücre hattı üzerinde etkisi WST-1 canlılık testi ve koloni oluşum testi ile incelendi. Elde ettiğimiz verilere göre serbest metformin için doza bağlı olarak hücre canlılığını inhibe ettiği gözlemlenmiştir ve serbest metforminin IC<sub>50</sub> (hücre canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyon) değeri 38.2 mM olarak bulunmuştur. Chen ve arkadaşları, metforminin FTC-133 hücrelerinde inhibisyona neden olduğunu belirlemişlerdir (134). Ancak, PLGA-PEG polimeri için elde ettiğimiz verilere göre doza bağlı olarak yüksek bir azalış gözlemlenmemiştir. Koopaei ve arkadaşları, yumurtalık kanseri SKOV3 hücre hattı üzerinde serbest dosetaksiel (DOX), PLGA-PEG polimeri ve PLGA-PEG-DOX nanopartiküllerin etkilerini inceledi. Sonuçlarımıza benzer bir şekilde PLGA-PEG polimerinin doza bağlı olarak azalış göstermediği bulunmuştur (135). Ayrıca, 2022 yılında yayınlanan makalede, MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde MTT test ile incelenen PLGA-PEG polimerinin hücre canlılığını etkilemediği görülmüştür (126). Bu verilerin doğrultusunda biyolojik olarak parçalanabilen bu polimerler tedavi için nanopartikül sistemlerde kullanılabilir. İlaveten, çalışmamızda 72 saat boyunca FTC-133 hücre hattı üzerinde incelenen PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinde doza bağlı olarak hücre canlılığında düşüş gözlemlendi. Bununla birlikte, PLGA-PEG-MET (IC<sub>50</sub>: 31.9 mM) nanopartikülleri serbest metformin (IC<sub>50</sub>: 38.2 mM) ile karşılaştırıldığında IC<sub>50</sub> değerini düşürdüğu gözlemlenmiştir. Yapılan araştırmalarda, 72 saat boyunca MTT test ile incelenen T47D hücrelerinde metforminin IC<sub>50</sub> değeri 11.54 mM iken PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin IC<sub>50</sub> değeri 8.71 mM olarak bulunmuştur (135). Li ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınladığı bir makalede, FTC-

133 hücre hattı üzerinde PLGA-PEG miçellerine eklenmiş sorafenib (SOR) ilacı ve trans-retionik asit (ATRA) nanopartiküllerinin etkileri incelemiş ve in vitro sonuçlarına göre, PLGA-PEG-SOR-ATRA kombinasyonun, FTC-133 hücre hattında sinerjistik antitümör etkinliği gösterdiği bulunmuştur (136). Bu çalışmanın dışında Yu ve arkadaşının yayınladığı makalede, irinotekan (CPT-11) ilacı; PLGA, titanyum dioksit (TiO<sub>2</sub>) ve altın (Au) ile nanopartikül hale getirilip FTC-133 ve BCPAP (PTK) hücrelerinde incelenmiştir. Yapılan MTT testinde, 24 saat boyunca incelenen FTC-133 ve BCPAP hücrelerinde doza bağlı olarak sentezlenen nanopartikülün (CPT-11+PLGA+TiO<sub>2</sub>+Au) hücre canlılığını inhibe ettiği bulunmuştur (137). Riela ve arkadaşlarının yayınladığı makalede, kurkumin moleküllerinin taşınması için tirazolyum tuzları ile modifiye edilmiş halloysit nanotüpler geliştirdikleri ve BCPAP (PTK), 8505C (ATK), SW1736 (ATK) tiroid kanser hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir ve yapılan MTT testinin 72. saat verilerine göre tiroid kanser hücrelerinde nanopatiküllü kurkuminin, serbest kurkumine göre konsantrasyon ve zamana bağlı olarak daha fazla antikanser aktivite gösterdiği gözlemlendi (138). Yapılan çalışmalar ve elde ettiğimiz veriler ışığında, nanopatiküllü ilaç kombinasyonlarının serbest ilaç formlarına göre daha etkili olabilecekleri söylenebilir.

Western Blot analizleri ile FTC-133 hücre hattı üzerinde, mitokondriyel enerji metabolizmasında yer alan AMPK, p-AMPK, mTOR, ve apoptoz mekanizmasında yer alan PARP protein ekspresyonları seviyeleri incelendi. Verilerin ışığında 72 saatlik serbest metformin uygulaması sonrası mTOR ekspresyonu açısından anlamlı bir etki görülmezken; PLGA-PEG-MET nanopatikül uygulaması sonrası anlamlı bir azalma görüldü. Ayrıca, PLGA-PEG polimeri uygulanan FTC-133 hücrelerinde mTOR ekspresyonu açısından anlamlı bir fark görülmezken; protein ekspresyonunu 1,5 kat arttırdığı belirlenmiştir. FTC-133 hücrelerinde serbest metforminin mTOR ekspresyonunda anlamlı bir etki gösterememesinin sebebi; bu hücrelerde bulunan PTEN mutasyonundan kaynaklanıyor olabilir. PTEN geninin işlevi; PI3K(fosfotidilinositol-3 kinaz) /AKT sinyal yolağında, PIP3'ü defosforile ederek PI3K-AKT sinyal yolağını inaktive etmesidir. Bu sayede, PTEN geni negatif düzenleyici olarak rol oynar (30). Ayrıca PTEN eksikliğine sahip tiroid kanser hücrelerinde tedavi sırasında iyot alımının düşmesine yol açar (139). Yapılan

çalışmalarda FTC-133 hücrelerinin PTEN mutasyonuna sahip olduğu görülmüştür. (140,141)

Diğer deney sonuçlarına göre, FTC-133 hücrelerinde 72 saatlik serbest metformin uygulamasında total AMPK ekspresyonları açısından anlamlı bir etki gözükmezken; PLGA-PEG-MET nanopartikülü uygulaması sonrası istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Ayrıca serbest metformin ve PLGA-PEG-MET nanopartikül uygulanan FTC-133 hücrelerinde p-AMPK ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Bikas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, FTC-133 ve BCPAP hücre hatları üzerinde metforminin etkileri düşük ve yüksek glukoz içeren ortamlarda incelenmiş ve yapılan western blot analizlerinde, 48 saat düşük glukoz ortamında inkübe edilen FTC-133 ve BCPAP hücrelerinde metforminin AMPK aktivasyonu gösterdiği ve p-AMPK düzeylerinde çok fark yaratmadığı, yüksek glukoz ortamda ise metforminin p-AMPK düzeylerinde önemli etki göstermediği belirlendi. Fakat, düşük glukoz ortamında metforminin p-S6 gen ekspresyonunda önemli ölçüde azalmaya sebep olduğu belirlendi. Bu yüzden Bikas ve arkadaşları tiroid kanseri hücrelerinin metformine yanıtının AMPK'ya bağımlı mekanizmalar olduğu gibi AMPK'dan bağımsız mekanizmalar olabileceğini ileri sürmüştür (60). Kalender ve arkadaşlarının yayınladığı makalede, metforminin AMPK'dan bağımsız olarak, Rag GTPazlar aracılığı ile mTORC1 sinyalini inhibe ettiği ve p-S6 geninin ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (143). Gwiedzinska ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, TT, MZ-CRC-1 hücre hatları üzerinde metforminin, AMPK'nin varlığında veya yokluğunda p-S6 geninin ekspresyonunu azalttığını bulmuşlardır (144). mTOR, protein sentezinde efektör olan S6K1'nin (ribozomal protein S6 kinaz 1) ve 4EBP1'in (ökaryotik çeviri başlatma faktörü 4E(eIf4E) bağlayıcı protein) fosforilasyonuna sebep olur. 4EBP1 inaktif hale gelirken aktive olan S6K1, S6 gibi hücreSEL substratları fosforile ederek mRNA translasyonunu ve hücre büyümesini destekler (şekil 3) (30). Han ve arkadaşlarının yayınladığı makalede , SW579 tiroid kanseri hücreleri ile muamele edilen metforminin p-AMPK ekspresyonunu arttırdığı ve p-mTOR ekspresyonunu inhibe ettiğini belirlenmiştir (3).

Çalışmamızda western blot analizleri PARP ekspresyonu açısından incelendiğinde, FTC-133 hücre hattı üzerinde serbest metforminin, PLGA-PEG

polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartikülünün istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi görülmemiştir. Sonuçlarımıza benzer bir şekilde; Bikas ve arkadaşları, düşük ve yüksek glukoz ortamında FTC-133 ve BCPAP hücrelerinde metforminin, PARP bölünmesinin indüksiyonu ile ilişkili olmadığını belirlemiştir. Bunun dışında, düşük glukoz ortamında FTC-133 hücrelerinde metforminin, otofaji markeri olan LC3B-II ekspresyonunda artışa neden olduğunu saptamıştır (60). Ayrıca Gwiedzinska ve arkadaşlarının yayınladığı makalede, FTC-236 ve BCPAP hücrelerinde metformin uygulaması sonrası metforminin PARP bölünmesinde önemli bir etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir (145). Plews ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, PTEN mutasyonuna sahip FTC-133 hücrelerinde OSU-53 (AMPK aktive eden ajan) ilacının etkilerinin incelendiği ve 48 saatlik ilaç muamelesinden sonra FTC-133 hücre hattı üzerinde PARP bölünmesinde herhangi bir artış görülmediği saptamıştır (145). Gwiedzinska ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, metformin ile tedavi edilen medüller tiroid hücrelerinde (TT, MZ-CRC-1 hücre hatları) parp ve kaspaz-3 ekspresyonlarında herhangi değişiklik gözlemlenmemişlerdir. Bu verilerden dolayı, metforminin tiroid kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğini ileri sürülmüştür (144). Kim ve arkadaşlarının yayınladığı makalede, serbest metforminin, serbest gemigliptinin ve metformin+gemigliptin kombinasyonlarının SW1736 (ATK) ve TPC-1 (PTK) hücre hatları üzerindeki etkilerine bakıldığında Western blot analizlerine göre, üç grubun PARP ekspresyonları üzerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığını görülmüştür (146). Poli (ADP-riboz) polimeraz PARP, DNA'nın hasar onarımından sorumlu olan bir nükleer enzimdir. PARP, apoptozun kaspaz bağımlı yolağın parçası olduğu gibi kaspazdan bağımsız yolda da bulunabilir (148). Kheder ve arkadaşlarının yayınladığı makalede, tiroid kanseri (FTC-133, 8505C, K1E7) hücrelerinde, metforminin DNA hasarına neden olmadığını bulmuşlardır. Sadece, 6 gün boyunca 20 mM metformin ve radyasyon (IR) tedavisinden sonra tiroid kanseri hücrelerinde DNA hasarı gözlemlenmişler fakat, radyasyon olmayınca 20 mM metforminin hücrelerde DNA hasarına neden olmadığını belirlemişlerdir (149). Bulduğumuz veriler ile diğer makalelerin verileri karşılaştırıldığı zaman, tiroid kanser hücrelerinde, metforminin PARP ekspresyonu üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığını söyleyebiliriz.

## 6.SONUÇ ve ÖNERİLER

1. PLGA-PEG polimerlerinin sentezinde mikrodalga ışıma yöntemi bu tez çalışmasında kullanılmıştır. Ardından, çift emülsiyon yöntemi kullanılarak serbest metformin, PLGA-PEG polimeri ile konjuge edilerek (PLGA-PEG-MET) nanopartikülleri sentezlendi.

2.Serbest metforminin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin hücre canlılığına ve mTOR, AMPK, p-AMPK ve PARP gibi proteinlerin ekspresyonlarına etkisi incelendi.

3. Yapılan karakterizasyon analizlerinde parçacık boyutu ve morfolojik yapısına göre, PLGA-PEG-MET nanopartikülünün boyutunun <250 nm'den küçük olduğu ve yapısının küresel şekillere sahip olduğu belirlenmiştir.

4. Yapılan çalışmalarda, serbest metforminin ve PLGA-PEG-MET nanopartikülünün doza bağlı olarak hücre canlılığını inhibe ettiği; PLGA-PEG polimerinin ise doza bağlı olarak hücre canlılığına etkisinin olmadığı saptanmıştır.

5.Western blot çalışmalarında, PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin FTC-133 hücre hattı üzerinde AMPK, p-AMPK ekspresyonlarını arttırdığı; mTOR ekspresyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, serbest metforminin, PLGA-PEG polimerinin ve PLGA-PEG nanopartiküllerinin PARP ekspresyonu üzerinde herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir. Bu yüzden serbest metformin ve PLGA-PEG-MET nanopartikülünün apoptoz mekanizması dışında başka ölüm yolağı mekanizmalarına etki ettiği düşünülmektedir.

6. Bu bulgular ışığında, PLGA-PEG-MET nanopartiküllerinin tiroid kanseri tedavisinde kullanımı önerilebilir. Bunun için, PLGA-PEG polimeri ile modifiye edilmiş metformin nanopartiküllerinin *in vitro* ve *in vivo* şartlarda teröpatik etkinliğinin geliştirilmesi gerekmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. M X. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer*.
2. Gimm O. Thyroid cancer. *Cancer Lett*. 26 Şubat 2001;163(2):143-56.
3. Han B, Cui H, Kang L, Zhang X, Jin Z, Lu L, vd. Metformin inhibits thyroid cancer cell growth, migration, and EMT through the mTOR pathway. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. Ağustos 2015;36(8):6295-304.
4. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 30 Ağustos 2011;7(10):569-80.
5. Petrulea MS, Plantinga TS, Smit JW, Georgescu CE, Netea-Maier RT. PI3K/Akt/mTOR: A promising therapeutic target for non-medullary thyroid carcinoma. *Cancer Treat Rev*. Eylül 2015;41(8):707-13.
6. Nguyen QT, Lee EJ, Huang MG, Park YI, Khullar A, Plodkowski RA. Diagnosis and Treatment of Patients with Thyroid Cancer. *Am Health Drug Benefits*. Şubat 2015;8(1):30-40.
7. Liu D, Xing J, Trink B, Xing M. BRAF mutation-selective inhibition of thyroid cancer cells by the novel MEK inhibitor RDEA119 and genetic-potiated synergism with the mTOR inhibitor temsirolimus. *Int J Cancer*. 15 Aralık 2010;127(12):2965-73.
8. Watkinson J. *Thyroid Cancer: A Comprehensive Guide to Clinical Management*, 2nd edn. *Ann R Coll Surg Engl*. Mayıs 2008;90(4):360.
9. Metformin and Silibinin co-loaded PLGA-PEG nanoparticles for effective combination therapy against human breast cancer cells - *ScienceDirect* .2023.
10. Klubo-Gwiedzinska J, Costello J, Patel A, Bauer A, Jensen K, Mete M, vd. Treatment with metformin is associated with higher remission rate in diabetic patients with thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. Ağustos 2013;98(8):3269-79.
11. Shen CT, Wei WJ, Qiu ZL, Song HJ, Zhang XY, Sun ZK, vd. Metformin reduces glycometabolism of papillary thyroid carcinoma in vitro and in vivo. *J Mol Endocrinol*. Ocak 2017;58(1):15-23.
12. Cheng CL, Yu LX, Lee HL, Yang CY, Lue CS, Chou CH. Biowaiver extension potential to BCS Class III high solubility-low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate-release tablet. *Eur J Pharm Sci*. 01 Temmuz 2004;22(4):297-304.

- 13.Cetin M, Sahin S. Microparticulate and nanoparticulate drug delivery systems for metformin hydrochloride. *Drug Deliv.* 12 Ekim 2016;23(8):2796-805.
- 14.Mu W, Qihui C.A Review on Nano-Based Drug Delivery System for Cancer Chemoimmunotherapy .*PubMed.* 5 Temmuz 2020;12(1):142.
- 15.Aldea M, Craciun L, Tomuleasa C, Berindan-Neagoe I, Kacso G, Florian IS, vd. Repositioning metformin in cancer: genetics, drug targets, and new ways of delivery. *Tumor Biol.* 01 Haziran 2014;35(6):5101-10.
- 16.Dang Y, Guan J. Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Smart Mater Med.* 2020;1:10-9.
- 17.Recent Advances in Thyroid Cancer Research - PMC [İnternet]. [a.yer 22 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9104463/>
- 18.Romano C, Martorana F, Pennisi MS, Stella S, Massimino M, Tirrò E, vd. Opportunities and Challenges of Liquid Biopsy in Thyroid Cancer. *Int J Mol Sci.* 19 Temmuz 2021;22(14):7707.
- 19.Non-coding RNA in thyroid cancer - Functions and mechanisms - PubMed.
- 20.Pizzato M, Li M, Vignat J, Laversanne M, Singh D, La Vecchia C, vd. The epidemiological landscape of thyroid cancer worldwide: GLOBOCAN estimates for incidence and mortality rates in 2020. *Lancet Diabetes Endocrinol.* Nisan 2022;10(4):264-72.
- 21.Kim J, Gosnell JE, Roman SA. Geographic influences in the global rise of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol.* Ocak 2020;16(1):17-29.
- 22.Zaballos MA, Santisteban P. Key signaling pathways in thyroid cancer. *J Endocrinol.* Kasım 2017;235(2):R43-61.
- 23.Cabanillas ME, McFadden DG, Durante C. Thyroid cancer. *Lancet Lond Engl.* 03 Aralık 2016;388(10061):2783-95.
- 24.Jin S, Borkhuu O, Bao W, Yang YT. Signaling Pathways in Thyroid Cancer and Their Therapeutic Implications. *J Clin Med Res.* Nisan 2016;8(4):284-96.
- 25.Jin S, Yang YT, Bao W. Signaling Pathways in Thyroid Cancer. *Vitam Horm.* 2018;106:501-15.
- 26.Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci CMLS.* Kasım 2008;65(22):3525-44.
- 27.Knauf JA, Fagin JA. Role of MAPK pathway oncoproteins in thyroid cancer pathogenesis and as drug targets. *Curr Opin Cell Biol.* Nisan 2009;21(2):296-303.
- 28.Zhang P, Guan H, Yuan S, Cheng H, Zheng J, Zhang Z, vd. Author Correction: Targeting myeloid derived suppressor cells reverts immune suppression and

- sensitizes BRAF-mutant papillary thyroid cancer to MAPK inhibitors. *Nat Commun.* 17 Kasım 2022;13(1):7025.
29. Singh A, Ham J, Po JW, Niles N, Roberts T, Lee CS. The Genomic Landscape of Thyroid Cancer Tumorigenesis and Implications for Immunotherapy. *Cells.* 01 Mayıs 2021;10(5):1082.
  30. Souza ECL de, Ferreira ACF, Carvalho DP de. The mTOR protein as a target in thyroid cancer. *Expert Opin Ther Targets.* Eylül 2011;15(9):1099-112.
  31. Porter A, Wong DJ. Perspectives on the Treatment of Advanced Thyroid Cancer: Approved Therapies, Resistance Mechanisms, and Future Directions. *Front Oncol.* 2020;10:592202.
  32. Pacifico F, Leonardi A. Role of NF-kappaB in thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 28 Mayıs 2010;321(1):29-35.
  33. Sastre-Perona A, Santisteban P. Role of the Wnt Pathway in Thyroid Cancer. *Front Endocrinol.* 29 Şubat 2012;3:31.
  34. Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet Lond Engl.* 08 Şubat 2003;361(9356):501-11.
  35. Differentiated Thyroid Cancer-Treatment: State of the Art - PubMed [Internet]. [a.yer 22 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28629126/>
  36. Brierley JD. Update on external beam radiation therapy in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* Ağustos 2011;96(8):2289-95.
  37. DeGroot LJ, Kaplan EL, Shukla MS, Salti G, Straus FH. Morbidity and mortality in follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 01 Ekim 1995;80(10):2946-53.
  38. Dandekar P, Harmer C, Barbachano Y, Rhys-Evans P, Harrington K, Nutting C, vd. Hyperfractionated Accelerated Radiotherapy (HART) for anaplastic thyroid carcinoma: toxicity and survival analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 01 Haziran 2009;74(2):518-21.
  39. Reiners C, Dietlein M, Luster M. Radio-iodine therapy in differentiated thyroid cancer: indications and procedures. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* Aralık 2008;22(6):989-1007.
  40. Luster M, Clarke SE, Dietlein M, Lassmann M, Lind P, Oyen WJG, vd. Guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* Ekim 2008;35(10):1941-59.
  41. Song HJ, Qiu ZL, Shen CT, Wei WJ, Luo QY. Pulmonary metastases in differentiated thyroid cancer: efficacy of radioiodine therapy and prognostic factors. *Eur J Endocrinol.* Eylül 2015;173(3):399-408.

42. Denaro N, Nigro CL, Russi EG, Merlano MC. The role of chemotherapy and latest emerging target therapies in anaplastic thyroid cancer. *OncoTargets Ther.* 16 Eylül 2013;9:1231-41.
43. Gupta-Abramson V, Troxel AB, Nellore A, Puttaswamy K, Redlinger M, Ransone K, vd. Phase II trial of sorafenib in advanced thyroid cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 Ekim 2008;26(29):4714-9.
44. Jin N, Jiang T, Rosen DM, Nelkin BD, Ball DW. Dual inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase and mammalian target of rapamycin in differentiated and anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* Ekim 2009;94(10):4107-12.
45. Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems - PubMed [Internet]. [a.yer 22 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26546751/>
46. Coperchini F, Croce L, Marinò M, Chiovato L, Rotondi M. Role of chemokine receptors in thyroid cancer and immunotherapy. *Endocr Relat Cancer.* Ağustos 2019;26(8):R465-78.
47. French JD. Immunotherapy for advanced thyroid cancers - rationale, current advances and future strategies. *Nat Rev Endocrinol.* Kasım 2020;16(11):629-41.
48. Moretti S, Menicali E, Nucci N, Guzzetti M, Morelli S, Puxeddu E. THERAPY OF ENDOCRINE DISEASE Immunotherapy of advanced thyroid cancer: from bench to bedside. *Eur J Endocrinol.* Ağustos 2020;183(2):R41-55.
49. Kollipara R, Schneider B, Radovich M, Babu S, Kiel PJ. Exceptional Response with Immunotherapy in a Patient with Anaplastic Thyroid Cancer. *The Oncologist.* Ekim 2017;22(10):1149-51.
50. Mehnert JM, Varga A, Brose MS, Aggarwal RR, Lin CC, Prawira A, vd. Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced, PD-L1-positive papillary or follicular thyroid cancer. *BMC Cancer.* 04 Mart 2019;19(1):196.
51. Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer: Breakthrough and Challenges of Targeted Therapy - PubMed [Internet]. [a.yer 22 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32244867/>
52. Fassnacht M, Kreissl MC, Weismann D, Allolio B. New targets and therapeutic approaches for endocrine malignancies. *Pharmacol Ther.* Temmuz 2009;123(1):117-41.
53. Kurzrock R, Sherman SI, Ball DW, Forastiere AA, Cohen RB, Mehra R, vd. Activity of XL184 (Cabozantinib), an oral tyrosine kinase inhibitor, in patients with medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 01 Temmuz 2011;29(19):2660-6.

54. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, vd. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet.* Şubat 2011;50(2):81-98.
55. The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes - PMC [İnternet]. [a.yer 22 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2014359/>
56. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia.* Eylül 2013;56(9):1898-906.
57. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer | *Nature Reviews Endocrinology* [İnternet]. [a.yer 22 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://www.nature.com/articles/nrendo.2013.256>
58. Hunter RW, Hughey CC, Lantier L, Sundelin EI, Peggie M, Zeqiraj E, vd. Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1-6-bisphosphatase. *Nat Med.* Eylül 2018;24(9):1395-406.
59. Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature.* 14 Şubat 2013;494(7436):256-60.
60. Bikas A, Jensen K, Patel A, Costello J, McDaniel D, Klubo-Gwiezdzinska J, vd. Glucose-deprivation increases thyroid cancer cells sensitivity to metformin. *Endocr Relat Cancer.* Aralık 2015;22(6):919-32.
61. Dowling RJO, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res.* 15 Kasım 2007;67(22):10804-12.
62. Wu Y, Gao WN, Xue YN, Zhang LC, Zhang JJ, Lu SY, vd. SIRT3 aggravates metformin-induced energy stress and apoptosis in ovarian cancer cells. *Exp Cell Res.* 15 Haziran 2018;367(2):137-49.
63. Zi F, Zi H, Li Y, He J, Shi Q, Cai Z. Metformin and cancer: An existing drug for cancer prevention and therapy. *Oncol Lett.* Ocak 2018;15(1):683-90.
64. Ozdemir Kutbay N, Biray Avci C, Sarer Yurekli B, Caliskan Kurt C, Shademan B, Gunduz C, vd. Effects of metformin and pioglitazone combination on apoptosis and AMPK/mTOR signaling pathway in human anaplastic thyroid cancer cells. *J Biochem Mol Toxicol.* Ekim 2020;34(10):e22547.
65. da Trindade MT, Kogawa AC, Salgado HRN. Metformin: A Review of Characteristics, Properties, Analytical Methods and Impact in the Green Chemistry. *Crit Rev Anal Chem.* 02 Ocak 2018;48(1):66-72.
66. Liang X, Giacomini KM. Transporters Involved in Metformin Pharmacokinetics and Treatment Response. *J Pharm Sci.* Eylül 2017;106(9):2245-50.

67. Goodarzi MO, Bryer-Ash M. Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents. *Diabetes Obes Metab.* Kasım 2005;7(6):654-65.
68. Dunn CJ, Peters DH. Metformin. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Drugs.* Mayıs 1995;49(5):721-49.
69. Wook Huh H, Na YG, Kang H, Kim M, Han M, Mai Anh Pham T, vd. Novel self-floating tablet for enhanced oral bioavailability of metformin based on cellulose. *Int J Pharm.* 05 Ocak 2021;592:120113.
70. Kingsley JD, Dou H, Morehead J, Rabinow B, Gendelman HE, Destache CJ. Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *J Neuroimmune Pharmacol Off J Soc NeuroImmune Pharmacol.* Eylül 2006;1(3):340-50.
71. Egusquiaguirre SP, Igartua M, Hernández RM, Pedraz JL. Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex.* Şubat 2012;14(2):83-93.
72. Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep PR.* 2012;64(5):1020-37.
73. Role of nanoparticles in the drug delivery system [İnternet]. [a.yer 22 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://www.hilarispublisher.com/proceedings/role-of-nanoparticles-in-the-drug-delivery-system-23885.html>
74. Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, vd. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat Nanotechnol.* 23 Ekim 2011;6(12):815-23.
75. Kumari P, Ghosh B, Biswas S. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *J Drug Target.* 2016;24(3):179-91.
76. Nanoparticles as carriers for drug delivery in cancer - PubMed [İnternet]. [a.yer 22 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30043651/>
77. Raj S, Khurana S, Choudhari R, Kesari KK, Kamal MA, Garg N, vd. Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy. *Semin Cancer Biol.* Şubat 2021;69:166-77.
78. Progress in Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Agents for Cancer Treatment Eleen Dayana Mohamed Isa 1, Haslina Ahmad 2,3,\*, Mohd Basyaruddin Abdul Rahman 2 and Martin R. Gill - Google'da Ara [İnternet]. [a.yer 22 Mayıs 2023].
79. Sutradhar KB, Amin ML. Nanotechnology in Cancer Drug Delivery and Selective Targeting. *Int Sch Res Not.* 16 Ocak 2014;2014:e939378.

80. Yoo J, Park C, Yi G, Lee D, Koo H. Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Cancers*. 08 Mayıs 2019;11(5):640.
81. Ma L, Chen Q, Ma P, Han MK, Xu Z, Kang Y, vd. iRGD-functionalized PEGylated nanoparticles for enhanced colon tumor accumulation and targeted drug delivery. *Nanomed*. Ağustos 2017;12(16):1991-2006.
82. Esmaeili F, Ghahremani MH, Ostad SN, Atyabi F, Seyedabadi M, Malekshahi MR, vd. Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate. *J Drug Target*. Haziran 2008;16(5):415-23.
83. Hu Y, Ke L, Chen H, Zhuo M, Yang X, Zhao D, vd. Natural material-decorated mesoporous silica nanoparticle container for multifunctional membrane-controlled targeted drug delivery. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:8411-26.
84. Patiño-Herrera R, Louvier-Hernández JF, Escamilla-Silva EM, Chaumel J, Escobedo AGP, Pérez E. Prolonged release of metformin by SiO<sub>2</sub> nanoparticles pellets for type II diabetes control. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 01 Nisan 2019;131:1-8.
85. Alavi M, Hamidi M. Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles. *Drug Metab Pers Ther*. 01 Şubat 2019;34(1).
86. Shukla SK, Kulkarni NS, Chan A, Parvathaneni V, Farrales P, Muth A, vd. Metformin-Encapsulated Liposome Delivery System: An Effective Treatment Approach against Breast Cancer. *Pharmaceutics*. 28 Ekim 2019;11(11):559.
87. Rawat M, Singh D, Saraf S, Saraf S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biol Pharm Bull*. Eylül 2006;29(9):1790-8.
88. Mundel R, Thakur T, Chatterjee M. Emerging uses of PLA-PEG copolymer in cancer drug delivery. *3 Biotech*. Şubat 2022;12(2):41.
89. Chan JM, Valencia PM, Zhang L, Langer R, Farokhzad OC. Polymeric nanoparticles for drug delivery. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2010;624:163-75.
90. Wang Y, Li P, Truong-Dinh Tran T, Zhang J, Kong L. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomater Basel Switz*. 01 Şubat 2016;6(2):26.
91. Acharya S, Sahoo SK. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev*. 18 Mart 2011;63(3):170-83.
92. Chatterjee M, Chanda N. Formulation of PLGA nano-carriers: specialized modification for cancer therapeutic applications. *Mater Adv*. 24 Ocak 2022;3(2):837-58.

93. Al-Nemrawi NK, Altawabeyeh RM, Darweesh RS. Preparation and Characterization of Docetaxel-PLGA Nanoparticles Coated with Folic Acid-chitosan Conjugate for Cancer Treatment. *J Pharm Sci.* 01 Şubat 2022;111(2):485-94.
94. Shi L, Zhang J, Zhao M, Tang S, Cheng X, Zhang W, vd. Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanoscale.* 24 Haziran 2021;13(24):10748-64.
95. Chemistry Routes for Copolymer Synthesis Containing PEG for Targeting, Imaging, and Drug Delivery Purposes - PubMed [Internet]. [a.yer 22 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31336703/>
96. Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angew Chem Int Ed Engl.* 23 Ağustos 2010;49(36):6288-308.
97. Goudarzi F, Asadi A, Afsharpour M, Jamadi RH. In Vitro Characterization and Evaluation of the Cytotoxicity Effects of Nisin and Nisin-Loaded PLA-PEG-PLA Nanoparticles on Gastrointestinal (AGS and KYSE-30), Hepatic (HepG2) and Blood (K562) Cancer Cell Lines. *AAPS PharmSciTech.* 01 Mayıs 2018;19(4):1554-66.
98. Lee JY, Shin DH, Kim JS. Anticancer Effect of Metformin in Herceptin-Conjugated Liposome for Breast Cancer. *Pharmaceutics.* 20 Aralık 2019;12(1):11.
99. Shweta Sharma, Ankush Parmar, Shivpoojan Kori, Rajat Sandhir. PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *Trends Anal Chem.* 2016;80:30-40.
100. Marinelli L, Ciulla M, Ritsema JAS, van Nostrum CF, Cacciatore I, Dimmito MP, vd. Preparation, Characterization, and Biological Evaluation of a Hydrophilic Peptide Loaded on PEG-PLGA Nanoparticles. *Pharmaceutics.* 29 Ağustos 2022;14(9):1821.
101. Polymers | Free Full-Text | Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier [Internet]. [a.yer 22 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://www.mdpi.com/2073-4360/3/3/1377>
102. Jeong B, Bae YH, Kim SW. Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 03 Ocak 2000;63(1-2):155-63.
103. Gu W, Fan R, Quan J, Cheng Y, Wang S, Zhang H, vd. Intracranial In Situ Thermosensitive Hydrogel Delivery of Temozolomide Accomplished by PLGA-PEG-PLGA Triblock Copolymer Blending for GBM Treatment. *Polymers.* Ocak 2022;14(16):3368.

104. Kamali H, Khodaverdi E, Hadizadeh F. Ring-opening polymerization of PLGA-PEG-PLGA triblock copolymer in supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids*. 01 Temmuz 2018;137:9-15.
105. Zhang J, Li Y, Gao W, Repka MA, Wang Y, Chen M. Andrographolide-loaded PLGA-PEG-PLGA micelles to improve its bioavailability and anticancer efficacy. *Expert Opin Drug Deliv*. Eylül 2014;11(9):1367-80.
106. Mohajeri SA, Yaghoubi S, Abdollahi E, Tekie FSM, Kamali H, Khodaverdi E, vd. In-vivo study of naltrexone hydrochloride release from an in-situ forming PLGA-PEG-PLGA system in the rabbit. *J Drug Deliv Sci Technol*. 01 Aralık 2016;36:156-60.
107. Hosseinasab S, Pashaei-Asl R, Khandaghi AA, Nasrabadi HT, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, vd. Synthesis, characterization, and in vitro studies of PLGA-PEG nanoparticles for oral insulin delivery. *Chem Biol Drug Des*. Eylül 2014;84(3):307-15.
108. Deb PK, Kokaz SF, Abed SN, Paradkar A, Tekade RK. *Pharmaceutical and Biomedical Applications of Polymers*. 2019;203-67.
109. Introduction to Polymer Science and Chemistry: A Problem-Solving Approach [İnternet]. [a.yer 22 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://www.routledge.com/Introduction-to-Polymer-Science-and-Chemistry-A-Problem-Solving-Approach/Chanda/p/book/9781466553842>
110. Badrzadeh F, Akbarzadeh A, Zarghami N, Yamchi MR, Zeighamian V, Tabatabae FS, vd. Comparison between effects of free curcumin and curcumin loaded NIPAAm-MAA nanoparticles on telomerase and PinX1 gene expression in lung cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2014;15(20):8931-6.
111. Khodaverdi E, Tekie FSM, Mohajeri SA, Ganji F, Zohuri G, Hadizadeh F. Preparation and investigation of sustained drug delivery systems using an injectable, thermosensitive, in situ forming hydrogel composed of PLGA-PEG-PLGA. *AAPS PharmSciTech*. Haziran 2012;13(2):590-600.
112. Senthilkumar M, Mishra P, Jain NK. Long circulating PEGylated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticulate delivery of Docetaxel to solid tumors. *J Drug Target*. Haziran 2008;16(5):424-35.
113. Amirsaadat S, Jafari-Gharabaghloou D, Alijani S, Mousazadeh H, Dadashpour M, Zarghami N. Metformin and Silibinin co-loaded PLGA-PEG nanoparticles for effective combination therapy against human breast cancer cells. *J Drug Deliv Sci Technol*. 01 Şubat 2021;61:102107.
114. Enhanced anti-proliferative and pro-apoptotic effects of metformin encapsulated PLGA-PEG nanoparticles on SKOV3 human ovarian carcinoma cells - PubMed [İnternet]. [a.yer 22 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30892093/>

115. Khodaverdi E, Tekie FSM, Hadizadeh F, Esmaeel H, Mohajeri SA, Tabassi SAS, vd. Hydrogels Composed of Cyclodextrin Inclusion Complexes with PLGA-PEG-PLGA Triblock Copolymers as Drug Delivery Systems. *AAPS PharmSciTech*. 01 Şubat 2014;15(1):177-88.
116. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts | Semantic Scholar [İnternet]. [a.yer 22 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-Biochemical-and-Cellular-Basis-of-Cell-Assays-Berridge-Tan/aa2987eb6edbe652fe5ae5b37a253412bed07b9a>
117. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays - PubMed [İnternet]. [a.yer 22 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6606682/>
118. Gıda » Makale » Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Laktik Asit Bakterilerinin Tanısında Kullanılması [İnternet]. [a.yer 22 Mayıs 2023]. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/gida/issue/6894/92229>
119. Li L, Cheng L, Sa R, Qiu X, Chen L. Real-world insights into the efficacy and safety of tyrosine kinase inhibitors against thyroid cancers. *Crit Rev Oncol Hematol*. Nisan 2022;172:103624.
120. Agate L, Minaldi E, Basolo A, Angeli V, Jaccheri R, Santini F, vd. Nutrition in Advanced Thyroid Cancer Patients. *Nutrients*. 18 Mart 2022;14(6):1298.
121. Can Butein be a Future Candidate for the Treatment of Advance Metastatic Thyroid Cancer? *J Cancer Immunol* [İnternet]. 22 Aralık 2022 [a.yer 22 Mayıs 2023];4(2). Erişim adresi: <https://www.scientificarchives.com/article/can-butein-be-a-future-candidate-for-the-treatment-of-advance-metastatic-thyroid-cancer>
122. Mustapha MT, Uzun Ozsahin D, Uzun B, Ozsahin I. Evaluation of the Thyroid Cancer Treatment Techniques with Fuzzy VIKOR. İçinde: 2022 Advances in Science and Engineering Technology International Conferences (ASET). 2022. s. 1-5.
123. Ghazy E, Kumar A, Barani M, Kaur I, Rahdar A, Behl T. Scrutinizing the therapeutic and diagnostic potential of nanotechnology in thyroid cancer: Edifying drug targeting by nano-oncotherapeutics. *J Drug Deliv Sci Technol*. 01 Şubat 2021;61:102221.
124. Ghandforoushan P, Hanaee J, Aghazadeh Z, Samiei M, Navali AM, Khatibi A, vd. Novel nanocomposite scaffold based on gelatin/PLGA-PEG-PLGA hydrogels embedded with TGF- $\beta$ 1 for chondrogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Int J Biol Macromol*. 15 Mart 2022;201:270-87.
125. Pereira ED, Cerruti R, Fernandes E, Peña L, Saez V, Pinto JC, vd. Influence of PLGA and PLGA-PEG on the dissolution profile of oxaliplatin. *Polímeros*. 07 Haziran 2016;26:137-43.

126. Jafari-Gharabaghlu D, Dadashpour M, Khanghah OJ, Salmani-Javan E, Zarghami N. Potentiation of Folate-Functionalized PLGA-PEG nanoparticles loaded with metformin for the treatment of breast Cancer: possible clinical application. *Mol Biol Rep*. Nisan 2023;50(4):3023-33.
127. Sulaiman TNS, Larasati D, Nugroho AK, Choiri S. Assessment of the Effect of PLGA Co-polymers and PEG on the Formation and Characteristics of PLGA-PEG-PLGA Co-block Polymer Using Statistical Approach. *Adv Pharm Bull*. Ağustos 2019;9(3):382-92.
128. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, vd. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 18 Mayıs 2018;10(2):57.
129. Frontiers | Fluorinated PLGA-PEG-Mannose Nanoparticles for Tumor-Associated Macrophage Detection by Optical Imaging and MRI [Internet]. [a.yer 23 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.712367/full>
130. Devasvaran K, Jairaman S, Yahaya NA, Jaganath IBS, Khung YL, Lim V, vd. PEG-b-PLGA Nanoparticles Loaded with Geraniin from *Phyllanthus Watsonii* Extract as a Phytochemical Delivery Model. *Appl Sci*. Ocak 2020;10(14):4891.
131. Shao X, Wei X, Song X, Hao L, Cai X, Zhang Z, vd. Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell Prolif*. 27 Mayıs 2015;48(4):465-74.
132. Liu H, Gong L, Lu S, Wang H, Fan W, Yang C. Three core-shell polymersomes for targeted doxorubicin delivery: Sustained and acidic release. *J Drug Deliv Sci Technol*. 01 Şubat 2021;61:102293.
133. Salamni Javan E, Lotfi F, Jafari-Gharabaghlu D, Mousazadeh H, Dadashpour M, Zarghami N. Development of a Magnetic Nanostructure for Co-delivery of Metformin and Silibinin on Growth of Lung Cancer Cells: Possible Action Through Leptin Gene and its Receptor Regulation. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. Şubat 2022;23(2):519-27.
134. Chen G, Xu S, Renko K, Derwahl M. Metformin inhibits growth of thyroid carcinoma cells, suppresses self-renewal of derived cancer stem cells, and potentiates the effect of chemotherapeutic agents. *J Clin Endocrinol Metab*. Nisan 2012;97(4):E510-520.
135. Noori Koopaei M, Khoshayand MR, Mostafavi SH, Amini M, Khorramizadeh MR, Jeddi Tehrani M, vd. Docetaxel Loaded PEG-PLGA Nanoparticles: Optimized Drug Loading, In-vitro Cytotoxicity and In-vivo Antitumor Effect. *Iran J Pharm Res IJPR*. 2014;13(3):819-33.

136. Farajzadeh R, Pilehvar-Soltanahmadi Y, Dadashpour M, Javidfar S, Lotfi-Attari J, Sadeghzadeh H, vd. Nano-encapsulated metformin-curcumin in PLGA/PEG inhibits synergistically growth and hTERT gene expression in human breast cancer cells. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* Ağustos 2018;46(5):917-25.
137. Li S, Dong S, Xu W, Jiang Y, Li Z. Polymer Nanoformulation of Sorafenib and All-Trans Retinoic Acid for Synergistic Inhibition of Thyroid Cancer. *Front Pharmacol* [İnternet]. 2020 [a.yer 21 Temmuz 2023];10. Erişim adresi: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.01676>
138. Yu T, Tong L, Ao Y, Zhang G, Liu Y, Zhang H. NIR triggered PLGA coated Au-TiO<sub>2</sub> core loaded CPT-11 nanoparticles for human papillary thyroid carcinoma therapy. *Drug Deliv.* Aralık 2020;27(1):855-63.
139. Development and characterization of co-loaded curcumin/triazole-halloysite systems and evaluation of their potential anticancer activity - PubMed .
140. Plantinga TS, Heinhuis B, Gerrits D, Netea MG, Joosten LAB, Hermus ARMM, vd. mTOR Inhibition promotes TTF1-dependent redifferentiation and restores iodine uptake in thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab.* Temmuz 2014;99(7):E1368-1375.
141. Saiselet M, Floor S, Tarabichi M, Dom G, Hébrant A, van Staveren W, vd. Thyroid cancer cell lines: an overview. *Front Endocrinol.*
142. Landa I, Pozdeyev N, Korch C, Marlow LA, Smallridge RC, Copland JA, vd. Comprehensive Genetic Characterization of Human Thyroid Cancer Cell Lines: A Validated Panel for Preclinical Studies. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 Mayıs 2019;25(10):3141-51.
143. Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, lé SB, Viollet B, vd. Metformin, Independent of AMPK, Inhibits mTORC1 In a Rag GTPase-Dependent Manner. *Cell Metab.* 05 Mayıs 2010;11(5):390-401.
144. Klubo-Gwiedzinska J, Jensen K, Costello J, Patel A, Hoperia V, Bauer A, vd. Metformin inhibits growth and decreases resistance to anoikis in medullary thyroid cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* Haziran 2012;19(3):447-56.
145. Klubo-Gwiedzinska J, Costello J, Patel A, Bauer A, Jensen K, Mete M, vd. Treatment with metformin is associated with higher remission rate in diabetic patients with thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* Ağustos 2013;98(8):3269-79.
146. Plews RL, Mohd Yusof A, Wang C, Saji M, Zhang X, Chen CS, vd. A novel dual AMPK activator/mTOR inhibitor inhibits thyroid cancer cell growth. *J Clin Endocrinol Metab.* Mayıs 2015;100(5):E748-756.
147. Kim SH, Kang JG, Kim CS, Ihm SH, Choi MG, Yoo HJ, vd. Synergistic cytotoxicity of the dipeptidyl peptidase-IV inhibitor gemigliptin with metformin in thyroid carcinoma cells. *Endocrine.* 01 Şubat 2018;59(2):383-94.

148. Agarwal A, Mahfouz RZ, Sharma RK, Sarkar O, Mangrola D, Mathur PP. Potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes. *Reprod Biol Endocrinol*. 05 Aralık 2009;7(1):143.
149. Kheder S, Sisley K, Hadad S, Balasubramanian SP. Effects of prolonged exposure to low dose metformin in thyroid cancer cell lines. *J Cancer*. 09 Nisan 2017;8(6):1053-61.



**8.EKLER**  
**EK-1**

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI**

Sayın Prof.Dr. Gülgün Oktay

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

<b>ETİK KOMİSYONUN ADI</b>	<b>DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ</b>
<b>AÇIK ADRES</b>	<b>GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</b>
<b>TELEFON</b>	
<b>FAKS</b>	
<b>E-POSTA</b>	

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	DOSYA NO:	6222-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> MÜNFERİT ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/> ÖÇM <input type="checkbox"/> YÜKSEKLİSANS <input checked="" type="checkbox"/> DOKTORA <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Metformin yüklü PLGA-PEG (Poli-D,L-laktik-Ko-glikolik asit-Poli Etilen Glikolik Asit) Nanopartikülerinin Sentezlenmesi ve Antikanser Etkilerinin Foliküler Tiroid Kanseri (FTC-133) Hücre Hattı Üzerinde in vitro İncelenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. Gülgün Oktay Tıbbi Biyokimya A.D.
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>

<b>DEĞERLENDİRİLEN BELGELER</b>	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input checked="" type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2021/11-25	Tarih:05.04.2021
	Prof.Dr. Gülgün Oktay'ın sorumlusu olduğu "Metformin yüklü PLGA-PEG (Poli-D,L-laktik-Ko-glukolik asit-Poli Etilen Glikolik Asit) Nanopartiküllerinin Sentezlenmesi ve Antikanser Etkilerinin Foliküler Tiroid Kanseri (FTC-133) Hücre Hattı Üzerinde in vitro İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

**ETİK KURUL BİLGİLERİ**

**ÇALIŞMA ESASI** Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyili Klinik Uygulamaları Kılavuzu

**ETİK KURUL ÜYELERİ**

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?	
				E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL (Başkan Yardımcısı)	Tıbbi Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Prof.Dr.Serkan YENER	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Prof.Dr.Pınar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Prof.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyostatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>

## EZGİ İTİL

### Kişisel Bilgiler

#### İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

#### Öğrenim Bilgileri

22 Ocak 2020 - Şu Anda (3 yıl 7 ay)  
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, BİYOKİMYA (YL) (TEZLİ)  
Diploma Numarası: -  
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.87 / 4.0

01 Eylül 2013 - 01 Temmuz 2019 (5 yıl 11 ay)  
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ, TÜRKİYE  
FEN FAKÜLTESİ, KİMYA BÖLÜMÜ  
Diploma Numarası: 03/07/2019  
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.75 / 4.0

#### Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: Orta)