



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİ ADP-RİBOZ POLİMERAZ İNHİBİTÖRÜ OLAPARİB'İN
NANOTAŞIYICI İLAÇ ŞEKLİNİN GELİŞTİRİLMESİ,
KARAKTERİZASYONU VE SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRE
HATTINDA HİDROJEN PEROKSİT İLE OLUŞTURULAN
HASARA KARŞI ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Elif BAYSALMAN
DOKTORA TEZİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK

Gaziantep
2023

**POLİ ADP-RİBOZ POLİMERAZ İNHİBİTÖRÜ OLAPARİBİN
NANOTAŞIYICI İLAÇ ŞEKLİNİN GELİŞTİRİLMESİ,
KARAKTERİZASYONU VE SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRE
HATTINDA HİDROJEN PEROKSİT İLE OLUŞTURULAN HASARA KARŞI
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Elif BAYSALMAN

Tez Savunma Tarihi: 25/07/2023

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Doç. Dr. Davut Sinan KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu çalışmanın bir “Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK
Prof. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK
Prof. Dr. Zeynel Abidin ÖZTÜRK
Doç. Dr. Nadire ESER
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet GÖL

İmzası

.....
.....
.....
.....
.....

BEYAN

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

25/07/2023

Elif BAYSALMAN

TEŞEKKÜR

Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarımın yürütülmesi, değerlendirilmesi ve yorumlanmasındaki her aşamada bana bilgi ve tecrübeleriyle desteklerini eksik etmeyen tez danışmanım Sayın Prof.Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez deneylerimin nanoformülasyon ayağının takip ve hazırlıkları konusunda yardım ve desteklerini sunan Sayın Hocam Prof. Dr. Tuncer DEĞİM'e; yine karakterizasyon aşamasında yardımcı olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gamze ÇAMLIK'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamızda kullandığımız SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattının temini için destek sağlayan Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalına teşekkürlerimi sunarım.

Tez jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK, Sayın Prof. Dr. Zeynel Abidin ÖZTÜRK'e, Sayın Doç.Dr. Nadire ESER ve Dr. Öğretim Üyesi Mehmet GÖL'e teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım boyunca yanımda olan hocalarıma, bölüm arkadaşlarıma ve özellikle Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ahmet SARACALOĞLU'na yardım ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmamın bir kısmını maddi olarak destekleyen Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı' na (Proje Numarası: TF.DT.20.10) teşekkür ederim.

Doktora sürecimde YÖK 100/2000 Doktora Bursu Programı dahilinde “Nanobiyoteknolojik Güdümlü İlaçlar” dalında çalışma yapmamı ve burs desteği almamı sağlayarak eğitimime katkı sağlayan Yüksek Öğrenim Kurumu'na teşekkür ederim.

Sadece doktora eğitimim boyunca değil tüm hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteğini hiç eksik etmeyen, her anımda yanımda olan, her koşulda bana inanan güvenen anne ve babama tüm kalbimle çok teşekkür ederim.

Elif BAYSALMAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGE VE KISALTMALAR	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
RESİM LİSTESİ.....	x
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Nörodejenerasyon	5
2.1.1. Oksidatif stres ve nörodejenerasyon	7
2.2. Serbest Radikaller ve Hidrojen Peroksit	10
2.3. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattı.....	12
2.3.1. SH-SY5Y Nöroblastoma hattının avantaj ve dezavantajları	13
2.4. Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP) Enzimi	13
2.4.1. Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP) enzimi inhibitörleri.....	18
2.4.2. Olaparib	22
2.4.3. Nanoformülasyonlar ve avantajları.....	23
2.4.4. Nanoformüle edilmiş Olaparib ve avantajları.....	24
2.4.5. Nanosüspansiyonlar	24
2.4.6. Nanosüspande edilmiş Olaparib ve avantajları.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Hücre Kültürü	27

3.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Üretimi ve Pasajlanması.....	27
3.3. SH-SY5Y Hatlarının Dondurulması ve Çözdürülmesi.....	28
3.4. H ₂ O ₂ Dozlarının Belirlenmesi	29
3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	30
3.6. MTT ve MTS Testi ile Toksisite Değerinin Belirlenmesi	33
3.7. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Sitotoksisite Testi	35
3.8. Olaparib için Etkin Dozun Tespit Edilmesi	36
3.9. Nanoformülasyonun Hazırlanması ve Karakterizasyonu	37
3.10. Partikül Boyutu ve Dağılımının İncelenmesi.....	37
3.11. Hücre Morfolojisinin Faz Kontrast Mikroskobu ile incelenmesi	37
3.12. Taramalı Elektron Mikroskobu (<i>Scanning Electron Microscope</i> , SEM) Analizi .	38
3.13. Nitrik Oksit (NO) Miktar Tayini	40
3.14. SH-SY5Y Homojenatında Malondialdehit Testi	41
3.15. SH-SY5Y Homojenatında Dinamik Tiyo/Disülfid Düzeyleri Ölçümü.....	42
3.16. SH-SY5Y Homojenatında Nitrotirozin Düzeyi Ölçümü	43
3.17. Western Blot Analizi	43
3.18. İstatistiksel Analiz.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Karakterizasyon Bulguları	46
4.1.1. Faz Kontrast Mikroskobu görüntüleri.....	46
4.1.2.Taramalı Elektron Mikroskobu (<i>Scanning Electron Microscope</i> , SEM) görüntüleri.....	50
4.2. Partikül Boyutu Ölçümü Bulguları	51
4.3. Biyokimyasal Bulgular	54
4.3.1. H ₂ O ₂ Dozlarının belirlenmesine ait bulgular	54
4.3.2. MTT ve MTS Testi ile sitotoksisite incelemesi bulguları	54
4.3.3. Laktat Dehidrogenaz (LDH) sitotoksisite testi bulguları.....	56

4.3.4. NO miktar tayini bulguları.....	57
4.3.5. SH-SY5Y Homojenatında Malondialdehit ölçümü bulguları	58
4.3.6. SH-SY5Y Homojenatında dinamik Tiyo/Disüfit düzeyleri ölçümü	59
4.3.7. SH-SY5Y Homojenatında Nitrotirozin düzeyi ölçümü bulguları	62
4.3.8. Western Blot Bulguları	63
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	71
6. KAYNAKLAR	77
7. ÖZGEÇMİŞ	90



SİMGİ VE KISALTMALAR

8-OHdG: 8-hidroksi deoksiguanozin

ADP: Adenozin Difosfat

ALS: Amyotrofik Lateral Skleroz

AML: Akut miyeloid lösemi

BCS: Biopharmaceutical Classification System

BER: Baz eksizyon onarımı

BOS: Beyin Omuilik Sıvısı

BRCA: BReast CAncer

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ER Stres: Endoplazmik Retikulum Stresi

FBS: Fetal Bovine Serum

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)

MDA: Malondialdehit

MMP: Matris metaloproteaz

MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt

MTT: Metiltiazoltetrazolium

NAD⁺: Nikotinamit Adenin Dinükleotid

NER: Nükleotit eksizyon onarımı

NO: Nitrik Oksit

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

NP: Nanopartikül

OAT3: Organic anion transporter-3

OATP1B1: Organic anion transporting polypeptide-1B1

OCT1: Organic cation transporters -1

OCT2: Organic cation transporters -2

PARP: Poli (ADP-riboz) polimeraz

PARP-1: Poli (ADP-riboz) polimeraz-1

PARP-2: Poli (ADP-riboz) polimeraz-2

PARS: Poli (ADP-Riboz) Sentaz

PART: Poli (ADP-Riboz) Transferaz

PSS: Periferik Sinir Sistemi

PUFA: Poly Unsaturated Fatty Acids (çoklu doymamış yağ asidi)

RNS: Reaktif Nitrojen Türleri (Species)

ROS: Reaktif Oksijen Türleri (Species)

SSS: Santral Sinir Sistemi

TBST: Tris Buffer Saline %0.05 Tween

TH: Tirozin Hidroksilaz



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Oksidatif dengenin bozulması ve etkileri	8
Şekil 2.2. Reaktif oksijen türlerine bağlı oluşan lipid peroksidasyon ürünleri	9
Şekil 2.3. Hidrojen peroksit ve oksidatif stres	12
Şekil 2.4. PARP-1 enziminin yapısı	15
Şekil 2.5. Parthanatos'ta PARP-1 aktivasyonu, PAR polimeri ve AIF aracılı ölüm sinyalinin şematik modeli	18
Şekil 2.6. BCS Sınıflandırması	26
Şekil 3.1. Tetrazoliumun mitokondriyal aktivite ile formazana dönüşümü	33
Şekil 3.2. MTS'nin formazana enzimatik dönüşümü	34
Şekil 4.1. Olaparib içeren Nanosüspansiyon için partikül büyüklüğü dağılım ölçümü örneği	53
Şekil 4.2. H ₂ O ₂ uygulaması sonucu MTT canlılık testi.....	54
Şekil 4.3. Hasar oluşturulan gruplara Olaparib uygulaması sonrası MTT ile sitotoksosite tespiti.....	55
Şekil 4.4. Hasar oluşturulan gruplara Olaparib uygulaması sonrası MTS sitotoksosite tespiti.....	56
Şekil 4.5. OLA ve NOLA gruplarında LDH miktar tayini bulguları	57
Şekil 4.6. OLA ve NOLA gruplarında NO miktar tayini bulguları.....	58
Şekil 4.7. OLA ve NOLA gruplarında MDA miktar tayini bulguları	59
Şekil 4.8. OLA ve NOLA gruplarında total tiyol miktar tayini bulguları	59
Şekil 4.9. OLA ve NOLA gruplarında doğal tiyol miktar tayini bulguları	60
Şekil 4.10. OLA ve NOLA gruplarında disülfid miktar tayini bulguları	60
Şekil 4.11. OLA ve NOLA gruplarında disülfid/doğal tiyol oranı bulguları	61
Şekil 4.12. OLA ve NOLA gruplarında disülfid/total tiyol oranı bulguları.....	61
Şekil 4.13. OLA ve NOLA gruplarında doğal tiyol/total tiyol oranı bulguları	62
Şekil 4.14. OLA ve NOLA gruplarında 3-NT miktar tayini bulguları.....	63
Şekil 4.15. OLA grubu PARP-1 Western Blot analizi örnek bant görüntüleri	64
Şekil 4.16. OLA gruplarında PARP-1 Western Blot sonuçları	65
Şekil 4.17. OLA grubu PARP-2 Western Blot analizi örnek bant görüntüleri	66
Şekil 4.18. OLA gruplarında PARP-2 Western Blot sonuçları	67
Şekil 4.19. NOLA grubu PARP1 Western Blot analizi örnek bant görüntüleri.....	68

Şekil 4.20. NOLA gruplarında PARP-1 Western Blot sonuçları	69
Şekil 4.21. NOLA grubu PARP-2 Western Blot analizi örnek bant görüntüleri.....	70
Şekil 4.22. NOLA gruplarında PARP-2 Western Blot sonuçları	70



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Kuşaklara göre PARP inhibitörleri	20
Tablo 3.1. Konvansiyonel verilişteki Olaparib grupları.....	31
Tablo 3.2. Nanosüspansiyonla verilişteki Olaparib grupları.....	32
Tablo 4.1. Nanopartikül (NP) partikül boyut ve dağılımı	51
Tablo 4.2. Olaparib-Nanopartikül (Ol-NP) partikül boyut ve dağılımı	52



RESİM LİSTESİ

Resim 3.1. 75 cm ² 'lik flaska hücre ekimi	28
Resim 3.2. H ₂ O ₂ 'ye bağlı hücre hasarı tayini deneyi esnasında oluşan formazan kristalleri	29
Resim 3.3. MTT ve MTS deneyi esnasında oluşan formazan kristalleri	35
Resim 3.4. 30 µM H ₂ O ₂ 'ye bağlı hücre hasarını farklı dozlarda Olaparib uygulaması sonucu canlılık miktarına etkisinin MTT ile incelenmesinden bir kesit.....	36
Resim 3.5. SEM'de görüntü alma ekranı	39
Resim 3.6. Zeiss Gemini SEM 300 cihazı.....	39
Resim 3.7. Reaksiyon ortamı haznesi	40
Resim 3.8. Reaksiyon ortamında kemilüminesans sinyali	41
Resim 3.9. Reaksiyon ortamında kemilüminesans sinyalinin oluşturduğu pikler	41
Resim 3.10. Spektrofotometrik ölçümü cihazı	43
Resim 3.11. Western Blot'ta hücre lizatlarını kuyucuklara yükleme işlemi.....	45
Resim 4.1. Olaparib içeren geleneksel veriliş için faz kontrast görüntüleri.....	47
Resim 4.2. Olaparib içeren Nanosüspansiyon için faz kontrast görüntüleri	49
Resim 4.3. Etkin madde içermeyen boş nanoformülasyona ait SEM görüntüsü	50
Resim 4.4. Nanosüspansiyonu hazırlanmış Olaparibin SEM görüntüsü.....	50
Resim 4.5. OLA-PARP-1 Bant görüntüsü	64
Resim 4.6. OLA-PARP-1 Bant görüntüsü diğer gruplar.....	64
Resim 4.7. OLA-PARP-2 Bant görüntüsü	65
Resim 4.8. OLA-PARP-2 Bant görüntüsü diğer gruplar.....	65
Resim 4.9. NOLA-PARP-1 Bant görüntüsü	67
Resim 4.10. NOLA-PARP-1 Bant görüntüsü diğer gruplar.....	67
Resim 4.11. NOLA-PARP-2 Bant görüntüsü	69
Resim 4.12. NOLA-PARP-2 Bant Görüntüsü diğer gruplar.....	69

ÖZET

POLİ ADP-RİBOZ POLİMERAZ İNHİBİTÖRÜ OLAPARİBİN NANOTAŞIYICI İLAÇ ŞEKLİNİN GELİŞTİRİLMESİ, KARAKTERİZASYONU VE SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTINDA HİDROJEN PEROKSİT İLE OLUŞTURULAN HASARA KARŞI ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Elif BAYSALMAN

Doktora Tezi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK

Temmuz 2023, 90 Sayfa

Poli (ADP-riboz) polimerazlar (PARP), organizmada hasar gören hücrelerin onarım mekanizmalarında rol oynayan enzimlerden biridir. PARP, DNA hasarının onarımına katılır, hücre farklılaşması ve apoptozuna kadar geçen süreçte farklı biyolojik yollarda görev alır. PARP inhibitörlerinden Olaparib'in farmasötik özelliklerine bakıldığında yağda ve suda çözünürlüğü düşük olduğundan (BCS sınıf 4) nanosüspansiyon şekline getirilmiştir. Bu çalışmada, FDA onaylı bir PARP inhibitörü olan Olaparib'in ve nanoformülasyonunun hidrojen peroksit (H_2O_2) ile oksidatif hasar oluşturulmuş insan nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y'ye uygulanarak, nöroblastomalar üzerindeki olası antioksidan ve sitoprotektif etkilerini araştırmak ve Olaparib'in bu etkilerini *in vitro* ortamda karşılaştırmalı olarak incelemek amaçlanmıştır.

Çalışmamızda Olaparib grubu (OLA) ve nanosüspanse şekilde verilen Olaparib grubu (NOLA) incelendiğinde NOLA 100 μM grubunun, 100 μM alfa lipoik asit grubuna (ALA) yakın derecede MDA seviyelerinin azalttığı görülmektedir. Yine 100 μM OLA ve NOLA gruplarının her ikisi de alfa lipoik aside benzer şekilde 3-NT ve LDH seviyelerini düşürmüştür.

Elde ettiğimiz sonuçlara baktığımızda bazı parametreler açısından yüksek doz Olaparib uygulamasının alfa lipoik asite benzer derecede antioksidan ve sitoprotektif etkiler sergileyebileceğine ait bulgulara ulaşılmıştır. Ancak bu etkiler incelediğimiz tüm parametrelerce desteklenmemiştir. Bu açıdan PARP inhibitörleri ile yapılacak daha fazla bilimsel veriye ihtiyaç vardır. Çalışma sonuçları özellikle nanofarmasötiklerin Olaparib gibi yağda ve suda çözünürlüğü düşük olma potansiyeli taşıyan etkin maddeler için hücresel emilim ve hedefleme açısından umut verici olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: PARP, Olaparib, Oksidatif Stres, Nanosüspansiyon, Nörotoksisite, SH-SY5Y

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND CHARACTERISATION OF POLY ADP-RIBOSE POLYMERASE INHIBITOR OLAPARIB NANOCARRIER DRUG FORM AND INVESTIGATION OF ITS EFFECTS AGAINST HYDROGEN PEROXIDE- INDUCED DAMAGE IN SH-SY5Y NEUROBLASTOMA CELL LINE

Elif BAYSALMAN

Ph.D.Thesis, Department of Medical Pharmacology

Supervisor: Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK

July 2023, 90 Pages

Poly (ADP-ribose) polymerases (PARP) are one of the enzymes that play a role in the repair mechanisms of damaged cells in the organism. PARP participates in the repair of DNA damage, takes part in different biological pathways in the process up to cell differentiation and apoptosis. Considering the pharmaceutical properties of Olaparib, one of the PARP inhibitors, it has been brought into nanosuspension form due to its low oil and water solubility (BCS class 4). In this study, we aimed to investigate the possible antioxidant and cytoprotective effects of Olaparib, an FDA-approved PARP inhibitor, and its nanoformulation on neuroblastomas by applying it to the oxidatively damaged human neuroblastoma cell line SH-SY5Y with hydrogen peroxide (H₂O₂).

In our study, when the Olaparib group (OLA) and the Olaparib group (NOLA) given in nanosuspension were examined, it was seen that the NOLA 100 µM group has reduced MDA levels close to the 100 µM alpha lipoic acid group (ALA). Again, both the 100 µM OLA and NOLA groups reduced 3-NT and LDH levels similar to alpha lipoic acid. When we looked at the results we have obtained, it has been found that high-dose Olaparib administration may exhibit antioxidant and cytoprotective effects similar to alpha lipoic acid in terms of some parameters. However, these effects were not supported by all the parameters we examined. In this respect, more scientific data is needed with PARP inhibitors. The results of the study showed that nanopharmaceuticals can be promising in terms of cellular absorption and targeting for active substances such as Olaparib, which have the potential to be low in oil and water solubility.

Key Words: Oxidative Stress, Neurodegeneration, PARP, Olaparib, Nanosuspension, Neurotoxicity, SH-SY5Y

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Nöronlar, santral sinir sisteminin yapı taşlarıdır. Nörodejenerasyon, nöronların işlevini engelleyen çeşitli hastalık ve durumları içine alan kapsayıcı bir terimdir (1, 2).

Nöronlar normalde çoğalmaz ve kendilerini yenilemezler, bu nedenle hasar görmeleri ve ölmeleri durumunda vücut tarafından yerine konamazlar. Nörodejenerasyonda meydana gelen hasarların genellikle irrevesibl olması oluşan hasarın önemini arttırmaktadır (1, 3).

Nöronlarda meydana gelen dejenerasyonlar çevresel etkilerle, rastlantısal olarak, genetik yatkınlıkla ya da bunların kombinasyonları şeklinde ortaya çıkabilirler (1, 3).

Nörodejeneratif hastalıklar, sinir hücrelerinin ilerleyici kaybı ile ilerleyen ve bu kayba bağlı olarak sinir sistemi fonksiyonlarının yitimine neden olan hastalıklar grubudur. Nörodejeneratif hastalıklara örnek olarak Parkinson, Alzheimer, Amyotrofik Lateral Skleroz, Huntington, Spinoserebellar Ataksi, Spinal Müsküler Atrofi gibi hastalıklar örnek verilebilir (1-3).

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar nörodejenerasyon kavramını bu hastalıklarla sınırlı tutmayıp; majör depresyon, şizofreni, bipolar gibi duygudurum bozukluklarının da altında yatan nedenin de olabileceğini göstermektedir. Bu durum da bize nörodejenerasyon ve nöroinflamasyon kavramlarının etki yelpazesinin çok daha geniş olabileceğine yönelik ipuçları vermektedir. Bu durum aynı zamanda tüm bu hastalıkların tamamen aynı olmasa da ortak bir takım nörodejeneratif patolojilerinin olabileceğini düşündürmektedir (4-9).

Nörodejenerasyonun altında yatan pek çok mekanizma vardır. Oksidatif stres de bunların içinde öne çıkanlardan biridir (10). Reaktif oksijen türleri (ROS) ile oluşturulan hasar modelleri ile çalışmalar bu nedenle son yıllarda hız kazanmıştır.

Beklenen ortalama yaşam süresinin yükselmesi en fazla nörodejeneratif hastalıkların görülme sıklığını arttırmıştır. Nörodejeneratif hastalıklar, sağlık gider hesaplamalarında maliyeti en hızlı yükselen hastalık gruplarının başında gelmektedir. Gelişmiş ve

gelişmekte olan ülkeler bu giderleri düşürebilmek için bu hastalıklara yönelik temel ve klinik çalışmalara öncelikle destek vermektedir (11).

Normal hücresel fonksiyonların sürdürülebilmesi için genom bütünlüğü korunmalıdır. Bu nedenledir ki deoksiribo nükleik asit (DNA) tamir mekanizmaları tüm hücreler için hayati önem taşır. Poli ADP-riboz polimeraz (PARP) enzimi de DNA tamir mekanizmasında rol alan enzimlerden biridir (12).

Yapılan literatür incelemelerine göre PARP inhibitörlerinin kimyasal analoglarıyla yapılan çeşitli çalışmalarda nöroinflamasyon, nörotoksosite ve nörodejenerasyon gibi olgularda umut vaat edici olması ön görülmektedir. Bu bakış açısıyla çalışmamızda daha önce kimyasal analoglarla çeşitli dejeneratif olgularda denenilen veya denenmiş PARP inhibitörleri yerine, FDA tarafından ilk onay alan ajan olan Olaparib tercih edilmiştir. Çalışmamızda *in vitro* çalışmalarda insan nöron hattına en yakın tercih olmasından dolayı SH-SY5Y nöronblastoma hattında nörodejenerasyonu taklit etmek amacıyla hidrojen peroksit (H₂O₂) ile indüklenen oksidatif hasara karşı Olaparib'in etkileri incelenmiştir.

Çalışmamızda PARP inhibitörlerinin farmasötik sınırlılıklarının giderilmesi, biyoyararlanımının artırılması ve toksisitesinin incelenmesi amacıyla nanoformülasyon şeklinde verilmesinin faydalı olacağı görüşüyle nanosüspanse edilmiş Olaparib uygulamasına yer verilmiştir. Bunun için de denenilen dozlardan en optimumu, konvansiyonel ve nanosüspansiyon formu olmak üzere iki farklı farmasötik şekil ile SH-SY5Y nöronblastoma hattına uygulanarak karşılaştırmalı olarak etki ve toksisite bakımından incelenmiştir.

Hazırlanan bu tez çalışmasında yeni terapötik ajanların kullanıldıkları endikasyondan farklı olası etkilerinin araştırılmasına ve aynı zamanda nanoformülasyonlarının geliştirilmesine ışık tutmak amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nörodejenerasyon

Nöronlar, sinir sisteminin temel yapı taşlarıdır. Kendilerine has işlevleri bulunmaktadır. Nöronlar arasındaki sinaptik bağlantılar vasıtasıyla hedef bölgedeki diğer nöronlara uyarıcı veya inhibe edici mesajlar gönderirler (13, 14).

Olgun somatik hücrelerin aksine, nöronlar minimum rejeneratif kapasiteye sahip hücrelerdir. Sinir sisteminde gerekli fizyolojik işlevini sağlamak için hayatta kalmaları gerekir. Nöronal ölümler her ne kadar uygun sinir sistemi gelişimini desteklemek için gerekli olsa da, erişkin bireylerde nöronal kayıplar kaçınılmaz olarak fonksiyonel düşüslere yol açar (14).

Nöronların strese olan yanıtları lokalize oldukları bölgeye göre farklılık arz edebilmektedir. Periferik sinir sisteminde (PSS) meydana gelen bir hasarda nöronların rejenerasyon kabiliyeti olmasına karşın, santral sinir sistemi (SSS) nöronlarının böyle bir özelliği bulunmamaktadır (15).

Periferik nöronlar trofik sinyallere karşı duyarlı olup, yaralanma sonrasında PSS gliası (Schwann hücreleri) rejenere olan aksonlarda büyümenin hızlanmasına yardım ederler. Nöron ve çevresindeki glia hücreleri morfolojik, metabolik ve biyokimyasal değişimle bu olaya karşı reaksiyon oluştururlar. Ancak SSS nöronlarının böyle bir özelliği olmadığından, meydana gelen hasar çoğu zaman geri dönüşsüz (irreversibl) etkiler bırakabilmektedir. Bu da SSS nöronlarını hasara daha açık hale getirmektedir (15).

Nöron kaybına sıklıkla, bozulmuş aksonal taşıma ve sinaptik fonksiyon, mitokondriyal ve lizozomal disfonksiyon, oksidatif stres, mikrogliyal aktivasyon ve kusurlu nöronlarda üretilen protein agregatları dâhil olmak üzere ek patolojiler eşlik eder. Yaşlanma, genetik risk ve çevresel faktörlerin bir kombinasyonunun nöronal homeostazı bozduğu ve nöronal dejenerasyonun başlatıcıları olan bu patolojilere neden olduğu düşünülmektedir (14, 15).

Santral sinir sistemi (SSS)'nde nöronlar oksijene de oldukça duyarlıdır. Oksijen miktarı azaldığında, nöronlarda dejenerasyon baş gösterir. Bu dejenerasyon, hasar ve hatta bazen ölümle sonuçlanabilir (13).

Nörodejenerasyon, beyinde nöron kaybının veya hasarının görüldüğü ve nöronların işlevselliğini yitirdiği patolojik durumların altında yatan ortak bir patolojidir. Nörodejeneratif bozuklukların ilerlemesi esas olarak aşırı nöron kaybı ve glial hücrelerin ölümü ile karakterize edilir. Bu durumda geri dönüşümsüz ve ilerleyici nöron kaybı söz konusudur ve genetik temelli olabildiği gibi çevreden maruz kalınan kimyasallar tarafından da tetiklenebilir (13-15).

Travmatik beyin hasarı ve inme gibi akut hasarlardan Alzheimer hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz (ALS) , Parkinson hastalığı (PH) gibi kronik durumlara kadar değişen nörodejeneratif tüm durumlarda hastalık ilerlemesinin temelini nöronal defektler ve ölümler oluşturur. Bu hastalıklar için de mevcut tedavi yaklaşımları olsa da hala yeterli seviyede değildir (16).

Aktif olan ve nöronal hücre ölümünü düzenleyen mekanizmalar nekroz, otofaji ve apoptozdur. Bu ölüm paradigmaları dejenere olan beyin dokusunda farklı kompozisyonlar halinde meydana gelebilir. Akut ve kronik nörodejenerasyon hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölümü ile ilişkilidir (16).

Otofaji, yanlış katlanmış proteinlerin ve hasarlı organellerin hücrelerden uzaklaştırıldığı ana süreçtir. Otofajinin bozulmasının birçok nörodejeneratif hastalık ve patoloji ile ilişkili olduğu bulunmuştur, bu da otofajinin nörodejenerasyon sürecinde hayati bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Son zamanlarda, giderek daha fazla sayıda çalışma, otofaji indükleyicilerinin, birçok nörodejeneratif hastalığın deneysel modellerinde koruyucu bir rol sergilediğini bildirmiştir. Bu tarz veriler otofajinin artırılmasının nörodejeneratif hastalıklar için potansiyel bir tedavi yaklaşımı olabileceğini düşündürmektedir (17).

Yanlış katlanmış proteinlerin agregasyonu, Endoplazmik Retikulum (ER) stresi, mitokondriyal yaşlanma ve disfonksiyon, nöroinflamasyon ve lizozomal sorunlar, ROS'ların aşırı salıverilmesi nörodejenerasyonu tetikleyen yaygın başlatıcı mekanizmalardandır. Ortalama yaşam süresinin uzaması nörodejeneratif hastalıklara

rastlanma sıklığını artırmaktadır. Bu durum da yaşlanmanın nörodejenerasyonda etkili olabileceğini düşündürmektedir (17, 18).

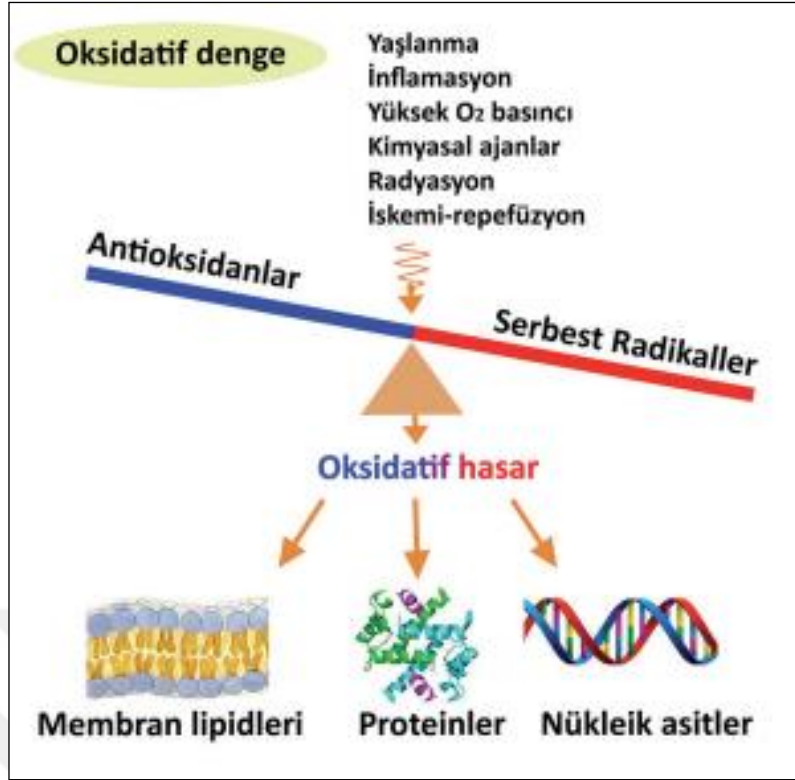
Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, nörodejeneratif hastalıklarda ve yaşlanmada poli (ADP-riboz)-polimeraz (PARP) enziminin inflamasyon ve otofaji düzensizliğinden kaynaklanan nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma patogenizinde önemli roller üstlenebileceğini ortaya koymaktadır (19, 20). Nörodejeneratif hastalıkların birçoğunda, bilişsel bozukluk ve/veya motor yetersizlik ile karakterize edilen kronik nörolojik durumlar yer alır ve sıklıkla yaşlı bireylerde görülür. Nörodejeneratif hastalıkların mekanizmaları, yaşlanan hücrelerde de gözlenen DNA hasarı, inflamasyon ve otofaji düzensizliğini içermektedir. Son yapılan çalışmalar, PARP-1'in nörodejeneratif hastalıklarda ve yaşlanmada da aktive olduğunu, bunun da nöroinflamasyona, otofaji düzensizliğine ve mitokondriyal disfonksiyona yol açtığını ortaya koymuştur (19-21).

2.1.1. Oksidatif stres ve nörodejenerasyon

Oksidatif denge, organizmanın homeostazı için önemli parametrelerden bir tanesidir. Hücresel metabolizma sırasında açığa hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi bir takım ROS'lar oluşur. ROS'ları detoksifiye eden antioksidan ajanların, üretilen ROS'lara yetersiz kalması oksidatif stres tablosunu oluşturur (22). ROS miktarındaki bu artışın sonucunda hücre membranlarında hasar oluşur. Buna bağlı olarak da hücre içinde bulunan protein, lipid, DNA gibi yapılarda bozulmalar meydana gelir (23).

Artan oksidatif stres ile oluşan ROS'lar hücre içi lipid ve protein yapılarında çift bağ içeren gruplara ve DNA'da baz çiftlerine saldırarak, hidrojen atomunu koparmak suretiyle zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatırlar. Bu durumda DNA zincirlerinde rastgele kırılmalar ve bağlanmalar meydana gelebilmektedir (21, 23).

Hasarın derecesi ve organizmanın buna vereceği yanıtı göre oluşan tablo değişebilmektedir. Oksidatif stres bazen hücreyi apoptozla ölüm yoluna götürse de bazen kanser, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet veya otoimmün bozuklukların gelişimine kadar birçok hastalığın patolojisine eşlik de edebilir (21, 23).



Şekil 2.1.Oksidatif dengenin bozulması ve etkileri (24)

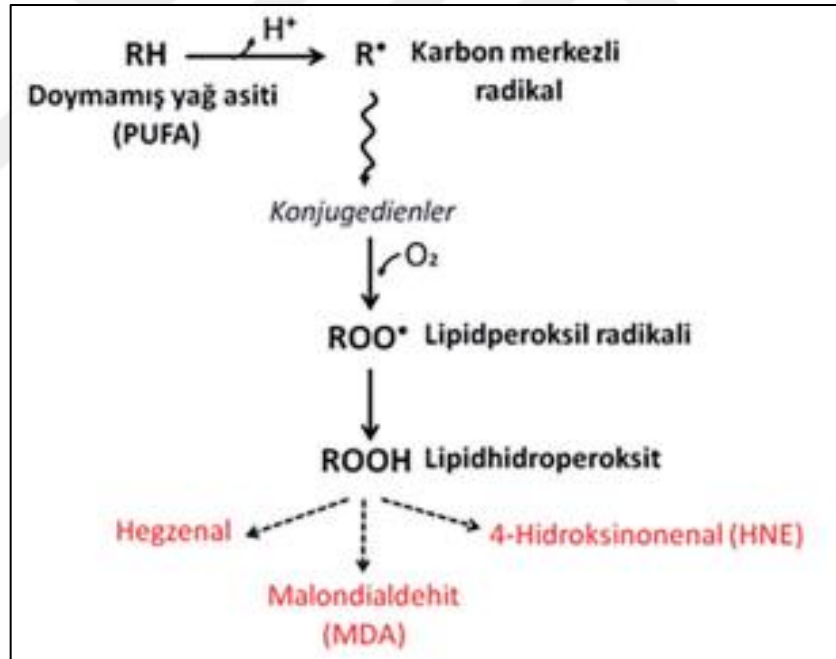
Oksidatif stresin üretimi, bir DNA onarım enzimi olan poli (ADP-riboz) polimeraz-1'in (PARP-1) aşırı aktivasyonu ile de ilişkilidir. DNA iplik kopuşuna cevap olarak PARP-1 enzimi, β -nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD^+) nikotinamid (NA) ve uzun poli (ADP-riboz) polimerlerine dönüştürür. PARP-1 aşırı aktive edildiğinde, anaerobik glikoliz ve ATP yetersizliğine yol açan mitokondriyal solunum gibi NAD^+ bağımlı süreçleri bozabilir. Bunun sonucunda ise ATP yetersizliği, enerji yetmezliği ve nöronal ölüm gerçekleşir (25, 26).

Oksidatif stres, aşırı peroksit üretimi ve antioksidanların tükenmesi yoluyla nöronal disfonksiyon ve ölümün bir başlatıcısıdır. Oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengesizliğin neden olduğu oksidatif stres, nöronal disfonksiyon ve nöronal ölümün tetikleyicisidir (27).

Oksidatif stres, pek çok nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynar. Beyin, oksidatif strese karşı diğer organlardan daha savunmasızdır.

İnsan beyni, vücut ağırlığının sadece %2'sini oluşturmasına rağmen, metabolizmamızdan sağlanan oksijenin yaklaşık %20'sini tüketir. Bu yüksek oksijen tüketimi, beynimizi oksidatif strese maruz kalma riski açısından diğer organlara göre daha açık ve duyarlı hale getirir. Yüksek metabolik aktiviteye sahip olduğu için de nöronlar oksidatif etkilere ve mitokondriyal disfonksiyona karşı savunmasızdır. Lipitlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin oksidasyonu Alzheimer, ALS, Parkinson, demans ve bunun gibi pek çok nörodejeneratif temelli hastalığın temelinde önemli etkilere sahiptir (28).

Beyin, nörotransmisyon süreçleri için kritik olan ve nöronal etkileşimlerin ve bilişsel fonksiyonların temeli olan fosfolipitler açısından zengindir. Beyin fosfolipitleri yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidi (*Poly Unsaturated Fatty Acids*, PUFA) özellikle dokosaheksaenoik asit ve araşidonik asit içerir. Serbest radikal oluşumundaki artış durumlarında, beyindeki PUFA içeriğinin giderek azaldığı görülmüştür (24, 29, 30).



Şekil 2.2. Reaktif oksijen türlerine bağlı oluşan lipit peroksidasyon ürünleri (24)

Beyinde artan oksidatif stres sonucu gerçekleşen lipit oksidasyonu, lipit hidroperoksitlerinin miktarını artırır. Bu yapılar serbest radikal artışının olduğu durumlarda kararsız yapıya bürünür ve kendiliğinden ayrışabilir. Yine beyin omurilik

sıvısı (BOS) içeriğinde yapılan ölçümlerde oksidatif stres artışına bağlı durumlarda MDA düzeylerinde de bir artış olduğu yapılan çalışmalarda doğrulanmıştır (31, 32).

İzoprostan üretimi de lipit peroksidasyonunun bir başka sonucudur. Esterifikasyon yoluyla araşidonik asitten üretilen izoprostanların, artan oksidatif stres koşullarında BOS'ta artmış olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (32, 33).

Oksidatif strese bağlı proteinlerin oksidasyonu BOS'taki 3-Nitrotirozin (3-NT) miktarında, nükleik asit oksidasyonu sonucu da 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG) miktarında artış olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (34-37).

Tüm bu veriler doğrultusunda nörodejeneratif hastalıklarda önemli oranda kan-beyin bariyerini (KBB) aşabilen antioksidanlara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

2.2. Serbest Radikaller ve Hidrojen Peroksit

Son 20 yıl içerisinde serbest radikallerin memelilerde hem zararlı ve hem de yararlı etkileri olduğu anlaşılmıştır. Reaktif oksijen türleri (ROS, *Reactive oxygen species*) ve reaktif nitrojen türleri (RNS, *Reactive nitrogen species*)'ni içine alan bu kavram birçok biyolojik sürecin konusunu oluşturur. Son orbitallerinde eşleşmemiş elektron çifti barındıran bu moleküller, oldukça elektrofilik yapılar olup, hücrede proton barındıran nükleofilik yapılara (nükleus, mitokondri gibi) saldırarak bazı olumsuz tabloların oluşmasından sorumlu tutulurlar. Bu sebeple ROS ve RNS'nin aşırı miktarda bulunması organizma için zararlı olarak kabul edilirken; makul konsantrasyonda bulunması halinde hücresel ve intrasellüler sinyal molekülleri olarak davranarak biyolojik prosesleri kolaylaştırmakta görev alırlar (38).

Hücreler, hassas ve kompleks savunma sistemi tarafından oksidatif strese karşı korunmaktadır. Serbest radikallerin biyolojik aktivitesi, endojen antioksidanlar ve antioksidan enzimler tarafından dengede tutulmaktadır. ROS'un sorumlu tutulduğu patolojilerde, antioksidan ajan uygulaması tedavi yaklaşımları arasındadır (39).

Serbest radikaller, membran üzerinde bulunan doymamış yağ asit zincirlerinin çift bağlarına da duyarlıdır. Lipit peroksiyon reaksiyonları sonucunda alkanlar, izoprostanlar, malondialdehit (MDA) oluşmaktadır (38, 39).

Serbest radikaller, amino asit rezidülerine atak yapabilirler. Hidroksil ($\text{OH}^\cdot$) radikali fenilalanin amino asidine atak yaparak orto, meta, para tirozine dönüştürür. Süperoksit ($\text{O}_2^\cdot$) anyonu ve Nitrik Oksit (NO) reaksiyonu ile meydana gelen peroksinitrit ($\text{ONOO}^\cdot$) ise tirozin rezidülerini orto pozisyonundan nitrolize ederek 3-nitrotirozini meydana getirir (39).

Lizin, arjinin, prolin ve treonin amino asitlerin oksidasyonu sonucu karbonil türevler keton ve aldehytler oluşur. Karbonil seviyeleri spektrofotometri, Western Blot, ELISA, immunassay ve GC/MS metotları ile tayin edilebilir (39).

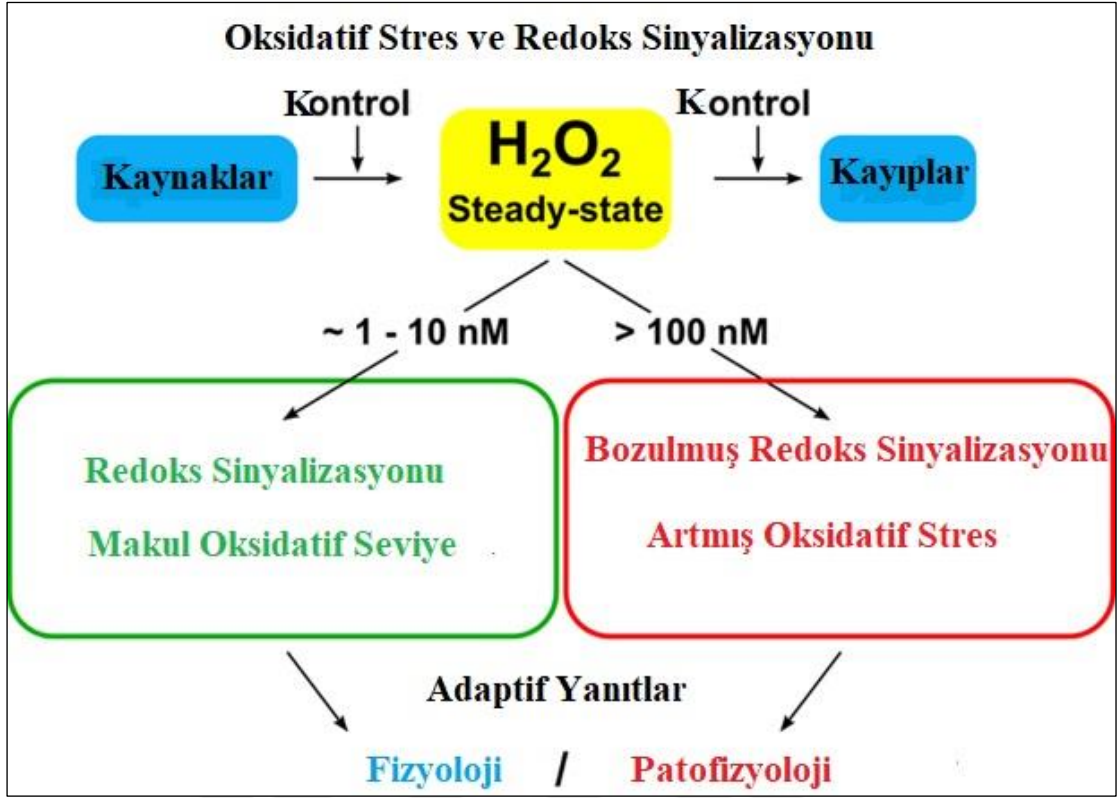
Serbest radikaller DNA ve RNA hasarını indüklerler. DNA ve RNA'nın en popüler biomarkerları guanin baz oksidasyonu ürünleri olan 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) olup HPLC ile saptanması mümkündür (39).

Koenzim Q10, vitamin C, vitamin E, B12, beta karoten, resveratrol, glutatyon ve bu bunların prekürsörleri antioksidan ajan olarak kullanılabilmektedir (39).

Hidrojen peroksit (H_2O_2), elektron transport zincirinde $\text{O}_2^\cdot$ indirgenmesiyle meydana gelmektedir ve organizma için yararlı etkilere sahiptir. Sitotoksik etkisinden dolayı hücre içerisindeki üretimi sıkı bir şekilde regüle edilir. H_2O_2 üretiminin major kaynağı mitokondridir ve sitozolik kararlı konsantrasyonu (*steady state*) antioksidan enzimlerin yardımıyla sürdürülür. H_2O_2 hücrede ikincil mesajcı olarak davranır, hücre proliferasyonu, apoptoz, vasküler remodelleme ve immün hücre aktivasyonun sinyal iletimini regüle eder. Sinyal molekülü olarak davranması için hücredeki kararlı konsantrasyonunun sentez ve metabolizma regülasyonu ile belirli seviyede kalması gerekir. NADPH oksidazlar, insülin sinyalizasyonu, anjiyogenezis, büyüme ve farklılaşma gibi fizyolojik süreçlerde rol oynarlar (39).

Hidrojen peroksitin düşük düzeyi antioksidanların aktivitesini tetikleyerek, ROS seviyesini düşürür ve böylece hücrenin hayatta kalmasına katkı sağlar. Yüksek konsantrasyonu ise prooksidanları aktive eder, ROS'u artırır ve hücreyi apoptoza indükler. Fizyolojik koşullarda H_2O_2 seviyesi 1-15 μM 'dir. H_2O_2 konsantrasyonu 50 μM aştığında sitotoksik etkiye sahiptir, 100 μM aşarsa ciddi patolojilere neden olabilmektedir (39).

Hücrenin H_2O_2 maruziyetinde TRPM2 kanalı aktivasyonu gerçekleşir ve buna bağlı olarak PARP enzimi aktive olur (38).



Şekil 2.3. Hidrojen peroksit ve oksidatif stres (39)

2.3. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattı

Bu hat SSS'nin *in vitro* modellemesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. SH-SY5Y hücre hattı, 1970 yılında 4 yaşındaki kanser hastası kız çocuğundan alınan metastatik bir kemik tümöründen oluşturulmuştur. Bu nöroblastom hücre hattı SK-N-SH'nin (ATCC HTB-11) üç kez pasajlanmış bir alt hattıdır (40).

SH-SY5Y nöroblastoma hattı hem tutunan hem de yüzen hücreler olmak üzere iki tip hücre bulundurur. Hat 37°C'de, %5 CO₂'de, nemli ortamda %15 fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS), penisilin (100 IU/ml) ve streptomisin (100 µg/ml) eklenmiş Eagle'ın minimum temel besiyerinde kültüre edilir (40).

SH-SY5Y hücre hattının bir diğer özelliği dopamin beta hidroksilaz enzim aktivitesine sahip olmasıdır. Bu sayede dopamini noradrenaline çevirebilmektedir. Yine aynı zamanda glutamati dekarboksilleyerek gamma amino bitürik asit (GABA) formuna da dönüştürebilmektedir (41).

SH-SY5Y hücrelerinin tercih edildiği bir diğer alan ise sinyal ileti sistemi çalışmalarıdır. Özellikle, NO ve Na⁺/K⁺-ATPaz pompasının aktivitesinin incelendiği çalışmalarda yine bu hat ön plana çıkmaktadır (41).

2.3.1. SH-SY5Y Nöroblastoma hattının avantaj ve dezavantajları

In vitro çalışmalarda kullanılan pek çok nöron hattı olmakla birlikte, birçoğu fare ve sıçan kaynaklı primer nöron hatları olup, kararsız karyotiplere sahip olabilirler. Bu sebeple gen ekspresyonu çalışmaları ve hücre sinyalizasyonunun tekrarlanabilir çalışmaları için problemlidir. Maksimum on beşinci pasaja kadar üretimi sağlıklı sonuçlar verebilir (41).

Tüm bu bakımlardan SH-SY5Y hücre hattı adrenerjik, kolinerjik ve dopaminerjik aktivite bakımından, insan fizyolojisini daha iyi yansıtmaktadır. Tirozin hidroksilaz (TH) ve dopamin-β-hidroksilaz enzimlerini içermektedir (41). İmmünoloji, nörobiyoloji, nöroviroloji, sinirbilim ve toksikoloji alanında yapılan çalışmalarda sıklıkla tercih edilen hatlardandır (42).

2.4. Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP) Enzimi

Poli ADP-Riboz Polimeraz (PARP) DNA zincir kırıklarını onarmaktan sorumlu olan genom bütünlüğünün korunmasında önemli roller üstlenen, nükleer bir enzimdir. Poli (ADP-Riboz) Sentaz (PARS) veya Poli (ADP-Riboz) Transferaz (PART) olarak da bilinmektedir (43-46).

Poli ADP-riboz (PAR) ile ilgili ilk çalışmalar 1963'te Strazburg'da Dr. Paul Mandel ile memeli nükleusunda; 1964'te ise Dr. R.J.Collier ve Dr. A.M. Pappenheimer tarafından difteri toksini üzerinde yapılmıştır (47).

Poli ADP-riboz polimeraz (PARP) enzimi hücrenin yaşamsal faaliyetlerini düzenleyen ve geniş etkilere sahip olan post-translasyonel modifikasyonlardan sorumlu ADP-ribozilasyon reaksiyonunu katalizleyen, DNA varlığında aktif olan multifonksiyonel bir yapıdadır (48, 49).

Bu enzim akseptör proteinler üzerine ADP-ribozil üniteleri transfer ederek poli ADP-riboz zinciri oluşturur. PARP enzimi DNA onarımı, hücre transformasyonu, apoptoz,

genomik stabilite ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi önemli hücresel faaliyetlerde rol oynar (48, 49).

ADP - ribozilasyon reaksiyonları metilasyon, fosforilasyon, glikozilasyon, asetilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlardır. Bu reaksiyonlarda indirgeyici bir substrat olan NAD koenzimi kullanılır (48).

NAD⁺ ökaryotik hücrelerde enerji metabolizmasındaki olaylarda temel bir koenzim/transmitter moleküldür. Redoks tepkimelerinin dengelenmesi ve ATP üretimi direkt hücrelerdeki NAD⁺ düzeylerine bağlıdır. Bu molekülün kimyasal yapısı, oksidatif fosforilasyon sırasında ATP'nin üretimine öncülük eden mitokondriyal elektron transport zinciri enzimleri aracılığıyla katalizlenen reaksiyonlarda hem NAD⁺'ın oksidasyonu yoluyla elektron akseptörü olarak; hem de NAD⁺'ın redüksiyonu ile elektron donörü olarak görev yapmasına olanak tanır (48).

NAD⁺ aynı zamanda çok yönlü ADP-ribozilasyon reaksiyonları için bir substrat veya öncül molekül gibi ayrı bir fonksiyona da sahiptir. NAD⁺'ın ADP-ribozun bir alıcısı olarak bulunduğu bu düzenleyici işlevlerde, hücre içi NAD⁺ miktarının azalmaması için devamlı bir NAD üretimine ihtiyaç vardır (49-51).

ADP-ribozilasyonu esnasında belli bir aminoasit üzerine ADP-riboz ünitesi eklenir. ADP-ribozilasyonu mono ADP-ribozilasyon ve poli ADP-ribozilasyon olmak üzere iki tipte gerçekleşir. Poli ADP-ribozilasyonu monodan farklı olarak ADP-riboz ünitelerinden meydana gelmiş bir polimer zinciri oluşturur. PARP için akseptör görevi gören yapılar ise Topoizomerez I, II, DNA polimeraz α , β , DNA ligaz gibi enzimlerdir (48, 49, 52).

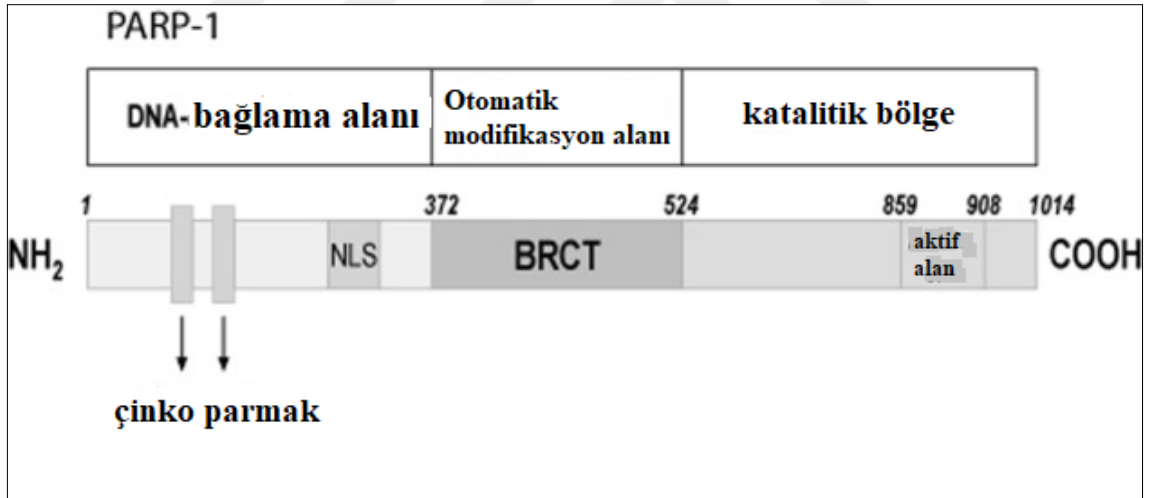
Bugüne kadar 18 adet PARP üyesi enzim tanımlanmıştır. PARP protein ailesinin en bol bulunan ve üzerinde en çok çalışma yapılan üyesi ise PARP-1 izoformudur. Daha az bilinen PARP-2 ve PARP-3 de, PARP-1'in bulunmadığı bölgelerde DNA tamirinde görev almaktadır (52).

PARP-1, başlıca poli (ADP-riboz) (PAR) sentezleyen enzimdir ve PAR sentezinin yaklaşık %90'nı oluşturur. 116 kDa molekül ağırlığına ve 1014 tane aminoasit

kalıntısına sahip olan PARP-1, çift çinko atomu içeren bir N-terminal DNA bağlama bölgesi, bir çekirdek lokalizasyon sinyal bölgesi, bir merkezi otomodifikasyon bölgesi ve bir de NAD⁺ dan ADP-riboz yapılarını protein akseptörüne transfer eden C-terminal katalitik bölgesinden oluşmaktadır (53).

Çinko parmak motifleri PARP-1'in hasarlı DNA üzerinde bölgesini tanıması ve tek ya da çift zincir kırıklı bölgelere PARP'ın yüksek afinite ile bağlanması için gereklidir. Çinko atomlarından biri çift zincir kırıklarına karşı PARP-1'i aktive ederken, diğeri tek zincir kırıklarına karşı aktivasyonu gerçekleştirir (54-56). PARP1 null fareler yaşayabilir ve gelişimlerini normal olarak sürdürebilir. Fakat hem PARP1 hem de PARP2 delesyonu embriyonik ölümle sonuçlanır (57).

Merkezi otomodifikasyon domaini poli(ADP-riboz)ilasyon bölgesini içermektedir ve PARP-1'in DNA ile bağlantısını düzenlemekle görevlidir. C-terminal bölgesi ise, NAD'ın bağlandığı bölgedir (52, 58).



Şekil 2.4. PARP-1 enziminin yapısı (54)

PAR bağımlı hücre ölümüne parthanatos adı verilir ve PARP1 tarafından aşırı PAR sentezi ile karakterizedir (48). Parthanatos kelimesi “PAR” ve Yunan mitolojisinde ölüm tanrısı olan “Thanatos” kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur (54). Hücre ölüm habercisi olarak bilinen PAR'ın aşırı oluşumundan dolayı hücre ölür (53). Serbest PAR'ların bazıları nükleusundan çıkar mitokondriye gider ve apoptoz-indükleyici faktörün (*apoptosis inducing factor*, AIF) mitokondriyel sızmayı artırır. Parthanatosun

hücre ölümünün klasik yolaklarından farklı olan biyokimyasal özellikleri şunlardır: hızlı PARP1 aktivasyonu, erken PAR birikimi, mitokondriyal depolarizasyon, erken nükleer AIF translokasyonu, DNA fragmentasyonu, hücrel NAD^+ ve ATP tükenmesi ve apoptoz (48, 59, 60).

Hücre ölümü terminoloji komitesi tarafından parthanatos iki ana kriterle tanımlanır (61). Birincisi, hücre ölümüne aşırı PAR sentezi eşlik etmelidir. İkincisi, PARP delesyonu veya inhibitörleriyle hücre ölümü tamamen veya kısmen önlenmelidir (61). PARP1 delesyonu, DNA hasarı ile indüklenen parthanatik hücre ölümüne karşı koruma sağlamak için yeterlidir (60). Parthanatos, nörodejenerasyonu da içeren çeşitli hastalıklardaki hücre ölümüne aracılık etmektedir (62). Aşırı aktive olan PARP1, hücrel enerji kaynaklarından NAD^+ ve ATP'nin hızla tükenmesi sonucu hücre ölümüne neden olur (63, 64). Bu, kaspazdan bağımsız bir apoptoz yolağıdır (48, 59, 65, 66). Ayrıca kaspazların PARP-1'i parçaladıkları ve inhibe ettikleri bilinmektedir (67). Dolayısıyla aşırı aktif PARP-1 fonksiyonunun inhibe edilmesi inflamasyon ve nörodejenerasyonda etkili olabilir (48, 64, 68).

DNA kırıkları, PARP-1'i selektif olarak aktiveleştirme özelliğine sahiptir. DNA hasarı durumunda aktiveleşen bu enzimler, DNA tamirinde rol alan bazı enzimlerin ribozilasyonu ile baz eksizyon tamiri, nükleotid eksizyon tamiri ve homolog rekombinasyon gibi yollarla hem tek hem çift zincir kırıklarında onarımı sağlar (52).

Hücredeki hasar PARP enzimini harekete geçirici birtakım sinyaller yollar. Buradaki sinyallerin sıklığı hücrenin kaderini belirler. Eğer sinyal sıklığı düşük ise PARP aktiveleşerek poli ADP-ribozilasyon ile DNA onarımını gerçekleştirir ve hücre canlılığı sürdürülür. Eğer sinyal sıklığı yüksek ise bu durumda hücre apoptoz veya nekroz yollarına götürülür ve onarım yapılmaz (52).

DNA hasarı ağır ise, PARP aktivitesinde aşırı artış gerçekleşir, bu halde enerji metabolizmasında önemli bir koenzim olan hücrel NAD seviyeleri hızla tükenir. NAD 'ın tükenmesi, daha az adenosin trifosfat (ATP) üretilmesine neden olur (52).

Bu durumda hücre, NAD'ı tekrar sentezlemek amacıyla ATP deplesyonu gerçekleştirir ve bu da enerji kıtlığına sebep olup hücreyi ölüme sürükler. Hücre ölümü AIF bağımlı apoptotik yolla veya nekrotik yolla olmaktadır (69, 70).

DNA hasarı orta derecede olduğunda PARP inhibitörleri uygulandığında, baz eksizyon tamir işlemi gerçekleşmez. DNA kırıkları ortamda birikir, hücre siklusu duraklar ve replikasyon azalır. Sonuçta apoptoz gözlenir (71).

Apoptoz, bilindiği gibi fizyolojik bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmemesi kanser ile sonuçlanır. Apoptotik uyaranlar arasında; DNA hasarı, kimyasal ajanlar (özellikle proteinlerin veya nükleik asitlerin sentezini baskılayanlar), büyüme faktörlerinin azalması ve hücre ölüm reseptörlerinin aktifleştirilmesi yer alır. PARP aktivitesi DNA hasarını takip eden süreçte hücre içindeki NAD miktarı ile yakından ilişkilidir. Poli (ADP-riboz) seviyelerinin ölçümü mümkün olduktan sonra yapılan çalışmalarda, apoptoz sırasında hücre içi NAD miktarının azalmasının PARP aktivasyonu ile doğrudan ilişkili olduğu ve hatta PARP yokluğunda apoptozun engellendiği tespit edilmiştir (48, 60, 72).

Masif DNA hasarında ise PARP-1 aktivasyonunun, AIF bağımlı apoptoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (60, 74). Tüm vücutta özellikle immün sistem ve germ hücrelerinde nükleer PARP aktivitesinin yüksek olduğu görülmüştür (75).

nedeniyle, topoizomeraz-1 inhibisyonu ve radyoterapinin etkisini kuvvetlendirerek sitotoksisiteyi artırdığı görülmüştür (82).

DNA hasarı yapan uyarılar PARP-1, PARP-2, PARP-3'ün uyarılmasına ve aktifleşmesine neden olur. Aktifleşen PARP'lar NAD^{+} 'tan ADP-riboz yapılarını protein akseptörüne transfer eder. Böylece NAD^{+} 'ı substrat olarak kullanarak ADP-riboz polimerlerini üretir. Bu yolla tek zincir DNA kırıkları onarılmış olur. PARP-1'in inhibisyonu durumunda ise bu tek zincir DNA kırıkları onarılamaz ve çift zincir DNA kırıklarına dönüşür. Bu bakımdan PARP-1 hem tek zincir hem de çift zincir kırıklarının tamirinde önemli rol oynar. Nükleotit eksizyon onarımı (NER), baz eksizyon onarımı (BER) gibi tamir mekanizmalarını tetikler. PARP inhibisyonu nedeniyle onarımı yapılamayan hücre apoptoza veya nekroza gider. PARP'lar hücre ölümünün düzenlenmesinde ikili rol oynar. PARP-1'in aşırı uyarılması apoptotik süreç için gereken NAD^{+} ve ATP'yi azaltarak apoptozu önlerken; PARP-1'in inhibisyonu ise apoptozu indükleyerek hücre ölümüne neden olur. Böylece bu ajanlar hem aşırı apoptozun hem de yetersiz apoptozun eşlik ettiği hastalıklarda kullanılabilir (83-86).

Tablo 2.1'de üç kuşak PARP inhibitörleri listelenmiştir. Birinci ve ikinci kuşaktaki ilaçların potensleri düşük olduğundan hiçbir klinik araştırmalar için faz çalışmalarına alınmamıştır (87). Üçüncü kuşaktaki inhibitörlerin 4 tanesi (Olaparib, rucaparib, niraparib ve talazoparib) ABD'de FDA onayı almıştır ve çoğunun klinik araştırmaları devam etmektedir. Fuzuloparib ve pamiparib ise over, fallop tüpü ve primer peritoneal kanser tedavisi için Çin'de onaylanmış PARP inhibitörleridir (88, 89). PARP enzimi, DNA hasarının onarımının yanı sıra hücre farklılaşması ve apoptozuna kadar geçen süreçte farklı biyolojik yollarda da görev alması nedeniyle kanser dışındaki hastalıklarda da etkisi incelenmektedir. Özellikle Alzheimer, Parkinson, nörodejenerasyon gibi patolojilerde araştırmalar sürmektedir. PARP inhibitörlerinin hücreleri iyonize radyasyona karşı duyarlı hale getirebileceği çok sayıda model göstermiştir (90).

Tablo 2.1. Kuşaklara göre PARP inhibitörleri (12, 43, 52, 90, 91)

	Potens	İlaç örnekleri
1. Kuşak	Milimolar konsantrasyonlarda aktif	3-aminobenzamit nikotinamit
2. Kuşak	Orta-mikromolar (<i>mid-micromolar</i>) konsantrasyonlarda aktif	5-methyl dihydroisoquinolinone (PD-128763) 8-hydroxy-2-methylquinazolin-4(3H)-one (NU-1025) 1,5-dihydroisoquinoline 5-aminoisoquinolinone (5-AIQ) 2-nitro-6[5H] phenanthridinone 4-amino-1,8-naphthalimide (ANI) N-(6-oxo-5,6-dihydro-phenanthridin-2-yl)- N,N-dimethylacetamide (PJ-34)
3. Kuşak (paribler)	Ultrapotent inhibitörler Düşük mikromolar - yüksek nanomolar konsantrasyonlarda aktif	Olaparib Rucaparib Niraparib Talazoparib Veliparib Mefuparib Simmiparib Pamiparib Fluzoparib

İniparibin (SAR240550, BSI-201) PARP üzerinde önemli bir inhibitör etkisi yoktur (90).

Bunlardan Olaparib 2014'te germline veya somatik BRCA(-) mutasyona uğramış (gBRCAm veya sBRCAm) ilerlemiş epitel over yumurtalık, fallop tüpü kanseri olan yetişkin hastalar için Olaparib'i (Lynparza®, AstraZeneca Pharmaceuticals LP, Wilmington, ABD) onaylanmıştır. Yine birinci basamak platin bazlı kemoterapiye tam veya kısmi yanıt veren primer periton kanseri için de endikasyon almıştır. Tablet ve sert

jelatin kapsül şeklinde farmasötik dozaj formları bulunmaktadır. Önerilen Olaparib tablet dozu günde iki kez 300 mg'dır (92). Olaparib ayrıca BRCA mutasyonlu HER2-negatif lokal ilerlemiş meme kanseri hastalarının tedavisi için 2019 yılında onaylanmıştır. Olaparib, BRCA-mutasyonlu metastatik pankreas adenokarsinomlu yetişkin hastaların tedavisi için Aralık 2019'da onaylanmıştır. Olaparib ve rucaparib BRCA1/BRCA2 mutasyonlu metastatik kastrasyona dirençli prostat kanseri hastalarının tedavisi için 2020'de onaylanmıştır (90).

2016'da ise Rucaparib tekrarlayan over, fallop tüpü veya primer periton kanserinin idame tedavisi için FDA onayı alarak piyasaya çıkmıştır. Rucaparib alacak hastaların, daha önce platin bazlı kemoterapiye tam veya kısmi yanıt vermiş olması gerekmektedir. Tablet ve sert jelatin kapsül şeklinde farmasötik dozaj formları bulunmaktadır. Önerilen Rucaparib dozu, günde iki kez 600 mg'dır (93).

Niraparib, 2017 yılında platin bazlı kemoterapiye kısmi veya tam cevap veren nüks epitel over, fallop tüpü veya primer peritoneal kanserin idame tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır (94, 95).

Talazoparib, BRCA mutasyonu olan HER2-negatif metastatik meme kanserinde monoterapi olarak kullanımı FDA tarafından Ekim 2018'de onaylanmıştır (96).

Bunların haricinde beyin, metastatik akciğer kanseri, primer perkütan koroner müdahale gören akut kalp krizi hastalarında, kolorektal tümörlerde, gliomada, ilerlemiş solid tümörlerle veya β -hücre malignitelerinde, solid metastatik tümörlü hastalarda, rekürren endometrial kanserde, akut miyeloid lösemi (AML), Eving sarkoması, pankreas, malignan solid tümör, peritonel kanser, akciğer kanseri, meme kanseri (TNBC: early triple-negative breast cancer), jinekolojik kanserler (endometriyum, over, serviks), kardiyovasküler hastalıklar, BRCA (+) pankreas kanseri, diyabetik retinopati, gastrointestinal tümörlerde, metastatik kastraksiyon dirençli prostat, SSS tümörleri için de devam etmekte olan klinik araştırmalar mevcuttur (96-98).

Selektivitesi ve potensleri yüksek olan PARP inhibitörleri, temozolomid ve sisplatin gibi çeşitli sitotoksik ilaçlar ile radyoterapinin etkinliğini potansiyalize etmeye yardımcı olurlar (99-101). Klinik olarak kullanıma sunulan bu PARP inhibitörleri için onkoloji

dışında potansiyel olarak terapötik yeni kullanımlarının (*repurposing*) araştırılmasının yolu açılmıştır. Genel olarak, onkolojik olmayan modellerde PARP inhibitörlerinin etkin dozları (1–5 mg.kg⁻¹ i.p.), kanser modellerinde kullanılan Olaparib dozlarından (50–200 mg.kg⁻¹.gün⁻¹ i.p.) daha düşüktür (102-104).

PARP inhibitörlerinin etki mekanizmaları göz önüne alındığında antikanser aktivite haricinde de etkileri olabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla yapılan araştırmalarda Parkinson, Alzheimer, Epilepsi gibi hastalıklarda ve nörodejenerasyon ile ilgili durumlarda da olumlu veriler elde edildiği görülmüştür (105-109).

2.4.2. Olaparib

Olaparib FDA tarafından BRCA mutasyonlu ve platine duyarlı kanser olgularında monoterapi olarak 2014 yılında Lynparza® ile hızlandırılmış onay alan bir PARP inhibitörüdür.

Paribler arasına maliyeti en uygun olan PARP inhibitörü olup, PARP-1 ve PARP-2 enzimlerinin potent inhibitörüdür. Olaparib PARP1 ve PARP2 için IC₅₀ değerleri sırasıyla 5 nM ve 1 nM'dır (109-115). Aralık 2014'te Olaparib'in kapsül formu BRCA-mutasyonu olan over kanserlerinde günde iki kez 400 mg kullanımı onay almıştır. Kanser hastalarına 400 mg kapsül formu verildikten sonra Olaparib'in ortalama eliminasyon yarılanma ömrünün 11.9 saat, klerensinin ise 8.64 litre/saat olduğu hesaplanmıştır (110). Oral biyoyararlanımı %79 olarak bildirilmiştir (116-120). Yeni geliştirilen tablet formunda oral biyoyararlanım artmıştır (108, 109). Tek doz 300 mg tablet sonrasında eliminasyon yarılanma ömrünün 14.9 saat, plazma klerensinin ise 7.4 litre/saat olduğu bildirilmiştir (108). Olaparib, hepatik ilaç uptake transportörleri (*organic anion transport polypeptide*, OATP)1B1 ve (*organic cation transporter*, OCT)1 ile renal uptake transportörleri OCT2 ve (*organic anion transporter*, OAT)3'ü inhibe eder (113). Bu inhibisyonlar Olaparib'in klerensini etkileyebilir. Olaparib kanser hastalarında genelde iyi tolere edilmektedir (113-114). Yapılan bir meta-analize göre Olaparib'in kanser hastalarında en yaygın görülen yan etkilerinin, bitkinlik (*fatigue*) ve anemi olduğunu göstermektedir (120-121).

2.4.3. Nanoformülasyonlar ve avantajları

Son yıllarda sıkça karşılaştığımız bir kavram nanotaşıyıcı ilaç sistemleridir. Disiplinlerarası bir bilim olan nanoteknoloji ve nanotıp uygulamaları giderek yaygınlaşarak geleneksel tedavilerin yerini almaya başlamıştır (122, 123). Gelişen farmasötik kimya çalışmaları birçok molekülün ilaç serüvenini hızlandırırken karşımıza düşük biyoyararlanım, düşük çözünürlük gibi sorunlar daha fazla çıkabilmektedir (122-124). Bu kısıtlılıkların giderilmesi amacıyla farmasötik teknoloji alanında yapılan yeni nanoformülasyonlar ve uygulamalar birçok etkin maddenin önünü açarken, özellikle kemoterapide sıkça uygulanan spesifik hedefleme uygulamaları da tedavi başarısını ve etkinliğini artırmada önemli yaklaşımlar olarak karşımıza çıkmaktadır (121, 122).

Nanotaşıyıcı sistemlerin bu avantajı sadece kanser hücreleri üzerinde değildir. Hedefleme kolaylığı, düşük toksisite ve istenilen bölgede terapötik doza kolay erişim gibi avantajların, KBB'yi geçmesi arzulanan SSS'de etkili birçok ilaç için de uygulanabilmesi oldukça güncel yaklaşımlar arasındadır (122).

Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde nörodejeneratif hastalıkların teşhis ve tedavisi için nanoteknolojiden faydalandığına sıkça rastlanmaktadır. Çünkü nörodejeneratif hastalıkların tedavisindeki en önemli zorluk, hedefe yönelik ilaç dağıtım sisteminin geliştirilmesidir (123). Geleneksel nörodejeneratif hastalık tedavi protokollerinde semptomları azaltmak hedeflenirken, nanokorlar, nano-antikorlar ve lipit nanopartiküller gibi bazı güncel nanoteknoloji yaklaşımlarının sinir hücrelerinde apoptozu geriletebildiği, iltihaplanmayı azaltabildiği ve beyin dokusunda ilaç dağıtımını iyileştirebildiği bazı çalışmalarca desteklenmiştir (124, 125).

Yapılan literatür taramalarında çeşitli PARP inhibitörleri kullanılarak yapılmış çeşitli nanotaşıyıcı ilaç sistemleri olduğu görülmüştür. Bu şekilde uygulandığında konvansiyonel uygulamalara kıyasla daha iyi ve etkili yanıtlar alındığı yayınlarda bildirilmiştir (126, 127).

2.4.4. Nanoformüle edilmiş Olaparib ve avantajları

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda Olaparib'in ve kimyasal analoglarının pek çok nanofarmasötik formla verilmiş denemelerine rastlanmıştır. Bu şekilde uygulandığında konvansiyonel uygulamalara kıyasla daha iyi ve etkili yanıtlar alındığı yayınlarda bildirilmiştir (121, 122).

Nanotaşıyıcı sistemlerin hedefleme kolaylığı, düşük toksisite ve istenilen bölgede terapötik doza kolay erişim gibi avantajlarının yanı sıra, kan beyin bariyerinden (KBB) geçiş ihtimalini yükseltmesi, özellikle santral sinir sisteminde etkili birçok ilaç için de uygulanabilmesi bu dozaj formlarını cazip kılmaktadır (122-123).

2011 yılında yapılan bir çalışmada Olaparib'in afinitesini ve bağlanma yüzdesini artırmak amacıyla manyetik nanoparçacık tabanlı bir yaklaşımla PARP nanosensorü hazırlanmıştır. Bu çalışma sonucunda nanoformülasyonun ilacın bağlanma afinitesinde artış sağlandığı görülmüştür (126-130). Prostat kanseri ve Pten/Trp53 eksikliği olan bir fare modelinden üretilen radyasyona dirençli hücreler ve tümörlerin, Olaparib'in lipit bazlı enjekte edilebilir bir nanoformülasyonu olan NanoOlaparib ile muamele edildiğinde radyasyona duyarlı hale geldiği bildirilmiştir (131). Karboplatin ve Olaparib kombinasyonunun kanser hücrelerinde sinerjistik toksik etkisi lipozom şeklinde hazırlanan nanoformülasyonla tümör hücrelerine karşı seçicilikte belirgin bir etkinlik artışın olduğu ve etkinin de önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (132). Bu çalışmaların hemen hepsi kanser hücrelerinde sitotoksik etkiyi arttırmaya, sinerjistik etki sağlamaya ve toksik etkiyi azaltmaya yönelik olduğu görülmektedir.

Olaparib, düşük hücre membranı permeabilitesi ve sulu solüsyonlardaki düşük çözünürlüğünden dolayı *Biopharmaceutical Classification System* (BCS) tarafından sınıf 4 ilaç olarak sınıflandırılmıştır (119). Olaparib'in bu kısıtlılıklarını ortadan kaldırmak veya azaltmak için bu projede nanotaşıyıcı ilaç şeklinin hazırlanarak *in vitro* uygulamayla insan nöroblastoma hattı olan SH-SY5Y'ye verilmesi hedeflenmiştir.

2.4.5. Nanosüspansiyonlar

Yeni farmasötik ürünlerin üretimindeki en kritik engel, suda ve yağda çözünürlüğün biyoyararlanıma uygun seviyede olmamasıdır. Bu sorunu gidermek ve biyoyararlanımı arttırmak için farmasötik teknoloji alanında pek çok farklı yaklaşım geliştirilmektedir.

Bunlardan birisi de nanosüspansiyonlardır ve son yıllarda popülerlik kazanmıştır. Nanosüspansiyon, çok ince kolloidal katı ilaç partiküllerinin sulu bir taşıyıcı içinde ve yüzey aktif maddelerle stabilize edilmiş dağılımıdır. Bu formülasyonlarda etkin madde partiküllerinin boyutlu 1000 nm'den küçük olup, genellikle 200-600 nm aralığındadır. Hazırlanmaları basit olup, diğer tekniklere göre daha avantajlıdır (134-136).

Nanosüspansiyon hazırlamanın bir diğer amacı, hedeflenen dokularda daha yüksek ilaç absorpsiyonu elde etmek için partikül boyutunu küçülterek ve ilaç partiküllerinin yüzey alanını artırarak ilacın çözünürlüğünü arttırmaktır. Nanosüspansiyon sadece ilaç çözünürlüğünü iyileştirmekle kalmaz, aynı zamanda ilacın farmakokinetiğini, güvenliğini ve etkinliğini de artırır. Emilimin artması, suda çözünme profili düşük olan ilaçların hedef dokuda istenilen konsantrasyona ve yüksek fiziksel/kimyasal kararlılığa sahip şekilde ulaşabilmesi nanosüspansiyonların avantajları arasında gösterilebilir (134).

Ayrıca diğer kolloidal sistemlere kıyasla teknik gereksinim basitliği ve maliyet etkinliği özelliklerinden dolayı nanosüspansiyonlar avantajlar içermektedir.

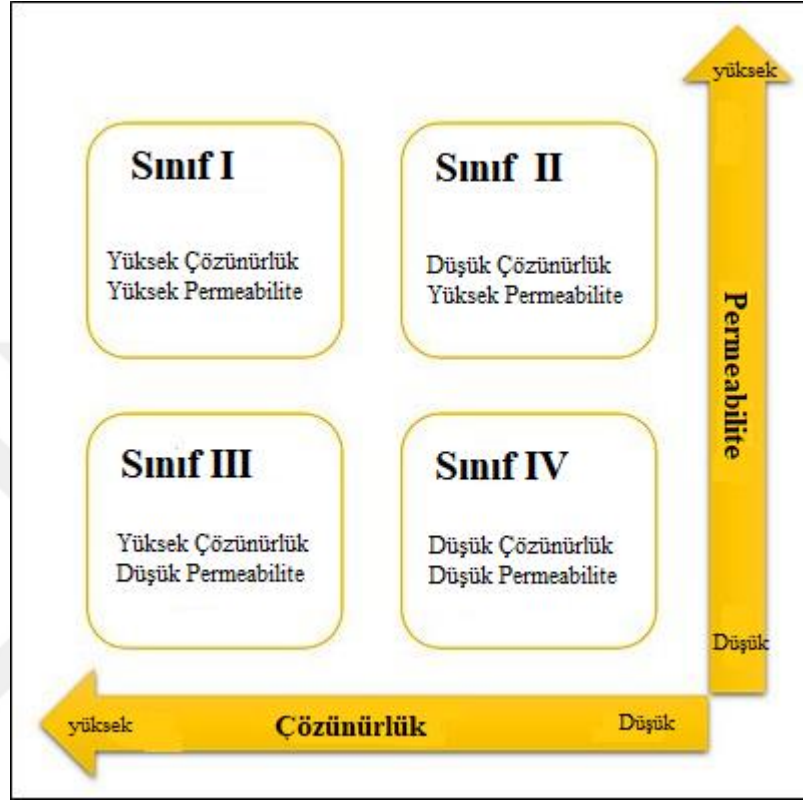
Nanosüspansiyonların etkinliği ve biyoyararlanımı etkileyen başlıca faktörler ise partikül boyutu ve dağılımı, morfolojik özellikler, kristal yapı, stabilizanlar ve uygulama yoludur (136).

Depolama sırasında dağılmış nanopartiküllerin sedimentasyon hızındaki artış nedeniyle fiziksel kararsızlık yaşanabilmesi dezavantajları arasındadır. Uygun polimer seçimi ile bu durumun üstesinden gelinebilir. Bir diğer dezavantaj ise bazı formülasyonların hacimleri sebebiyle taşıma ve nakliye sıkıntısı yaşanabilmesidir (137, 138).

2.4.6. Nanosüspande edilmiş Olaparib ve avantajları

Yapılan literatür incelemelerinde Olaparib'in ve kimyasal analoglarının çeşitli nanoformülasyonlarının çalışmalarda kullanıldığı görülmüştür. Olaparib'in olası faydalı etkisini destekleyecek bulgulara çalışmamızda erişilir ise ilacın ilerleyen aşamalarda KBB'yi geçebilmesi gerekmektedir. Olaparib'in yağda ve suda çözünürlüğünün düşük olması (BCS sınıf 4) çözünürlük ve buna bağlı olarak emiliminin az olması ajan için dezavantajdır (Şekil 2.6). Bu limitasyonlarının giderilmesi amacıyla bu ajanların daha

küçük partikül büyüklüğüne sahip olmasını sağlayacak ve böylelikle biyoyararlanımlarını artıracak nanoformülasyonlar şeklinde verilmesinin daha faydalı ve verimli olacağı görüşüyle Olaparib'in konvansiyonel verilış haricinde bir de uygun nanoformülasyonunun *in vitro* denenmesi fikri çalışmamızın hedeflerindendir.



Şekil 2.6. BCS Sınıflandırması (139)

Nanosüspansiyon şeklinin tercih edilmesinde uygun maliyet, hızlı ve pratik hazırlama kolaylığı ve uygulama avantajı sağlaması, konvansiyel verilışle aynı şekilde *in vitro* uygulanabilmesi ve değişik konsantrasyonlarının tarafımızca hazırlanabilmesi açısından bu formülasyon tercih edilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın tamamı *in vitro* yöntemlerden oluşup Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapılmış olup, Etik Kurul iznine gerek duyulmamıştır. Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından kısmen desteklenmiştir (Proje Numarası: TF.DT.20.10). Tez çalışması aynı zamanda konusu bakımından “Nanobiyoteknolojik Güdümlü İlaçlar” öncelikli başlığı altında YÖK 100/2000 Öncelikli Alan Doktora Programı çatısı altındadır.

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda insan nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y hücre hattı kullanılmıştır. Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu’ndan (ATCC) temin edilen SH-SY5Y (ATCC, CRL-2266) hücreleri Atatürk Üniversitesi’nden alınmıştır. Tüm kültür çalışmaları laminar akımlı kabin (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) içinde, steril şartlarda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 2 ile 9. arasındaki pasajlar kullanılmıştır.

3.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Üretimi ve Pasajlanması

-80 °C’de muhafaza edilen SH-SY5Y nöroblastoma hatları bir süre oda sıcaklığında bekletildikten sonra dondurma vasatı uzaklaştırılmıştır. Üzerine %10 fetal sıgır serumu (FBS, HyClone, Global Life Science, Pasching, Avusturya), %1 penisilin/streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B, GmbH, Ebsdorfergrund, Almanya) ve Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içeren besiyeri (Gibco, Grand Island, NY, ABD) yeterli miktarda karışım hazırlanarak ilave edilmiş ve 10 dk 10 000 rpm santrifüj işlemine tabi tutulmuştur (Eppendorf Centrifuge, 5810R, Merck, Darmstadt, Almanya). Sonrasında supernatant kısmından ayrılan pellet kısmı yine uygun miktarda besiyeri karışımı ilave edilerek pasajlanmaya uygun hücre grubu olarak kullanılmıştır.

Pasajlanmaya uygun SH-SY5Y hattı 75 cm²’lik flasklara (T75) ekilerek Resim 3.1’de gösterildiği gibi uygun miktarda besiyeri karışımı ilave edilmiştir. Hücrelerin morfolojisi inverted mikroskop (Leica, DM IL LED, Wetzlar, Almanya) altında kontrol edilerek, %5 CO₂ ve 37°C koşullarını sağlayan etüvde (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) inkübasyona bırakılmıştır. SH-SY5Y hücrelerinin durumu belirli aralıklarla inverted mikroskop (Leica, DM IL LED, Wetzlar, Almanya) altında kontrol

edilerek ve yüzeyi kaplama oranları yaklaşık %70'e ulaştığında doz uygulamasına hazır hale gelmektedir. Genellikle pasajlamadan 48 saat sonra bu konfluasyona ulaşmak mümkün olmaktadır.



Resim 3.1. 75 cm²'lik flaska hücre ekimi

3.3. SH-SY5Y Hatlarının Dondurulması ve Çözdürülmesi

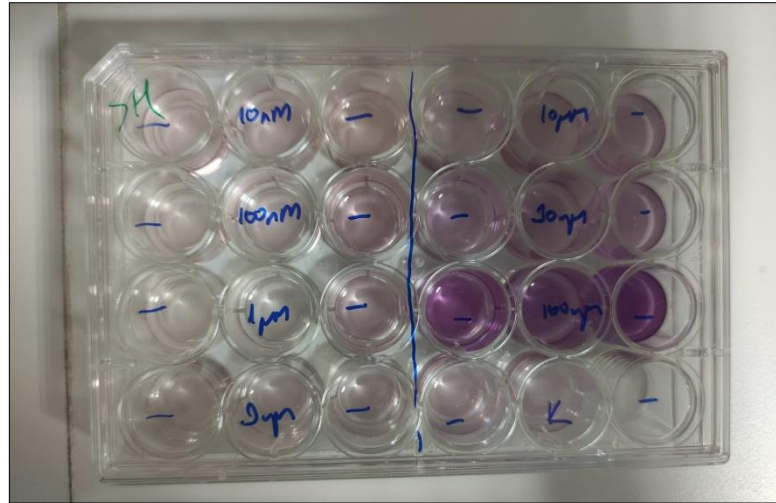
Hücre hatlarının uzun süre muhafaza edilebilmesi için -80°C'den -120°C'ye kadar aralıklarda dondurucularda saklanması gerekir. Bu koşullarda hücre canlılığının korunması işlemi için ise klasik besiyeri kullanılmaz. Dondurma vasatı dediğimiz özel karışım içerisinde saklanması gerekmektedir. Biz çalışmamızda dondurma vasatı olarak %10 oranında dimetilsülfoksit (DMSO) %90 oranında FBS'i tercih ettik. Bu karışımdaki DMSO hücre yapısını koruma özelliğinden ötürü birçok dondurma vasatında tercih edilen bir kimyasaldır (41, 42). Bazı hatların %90 besiyeri veya DMEM ortamına %10 oranında DMSO eklenerek saklandığı da bilinse de bizim çalışmamızda FBS tercih edilmiştir.

Hatlar dondurma işlemi öncesi yüksek konfluasyona ulaşan flaskalara tripsin (HyClone, Global Life Science, Pasching, Avusturya) uygulaması yapılarak tabandan kaldırılmıştır. Sonrasında 10000 rpm’de 5 dakika santrifüj (Eppendorf Centrifuge, 5810R, Merck, Darmstadt, Almanya) edilerek, süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Dondurulmaya kaldırılan hücrelerin özel kriyoviyallere alınması ve uygun dondurma vasatının ilave edilmesi ile hatlar dondurucuya girmeye uygun hale getirilmiştir.

3.4. H₂O₂ Dozlarının Belirlenmesi

Nörodejenerasyonda kronik oksidatif stresin rol oynadığı düşünülerek oksidatif hasar oluşturma modelleri açısından kronik H₂O₂ maruziyeti uygun görülmüştür. Yapılan literatür taramalarında 100, 200, 300 µM dozlarda hasar oluştuğuna dair veriler olması üzerine 0’dan başlayarak Resim 3.2’de olduğu gibi 24’lü kuyucuklarda doz çalışması yapılmıştır (38). %70 canlılık oranını sağlayacak H₂O₂ dozu tespit edilerek bu doz nörodejenerasyon için tez çalışması boyunca kullanılan hasar dozu olarak kabul edilmiştir.

Canlılık oranı tayini için hem MTT hem de MTS sitotoksosite testleri ile ayrı ayrı kullanılmıştır. Böylelikle hem yöntem kıyaslamasına gidilmiş hem de canlılık tayini sonucunun kesinliğinin artırılması amaçlanmıştır.



Resim 3.2. H₂O₂’ye bağlı hücre hasarı tayini deneyi esnasında oluşan formazan kristalleri

3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması

Yapılan ön çalışmada 30 μM H_2O_2 uygulamasının %70 canlılık sağladığı tespit edilmiştir. Bu sebeple nörodejenerasyon taklidi için uygun hale gelen SH-SY5Y nöronblastoma hatlarına Olaparib'in etkisi bakılırken bu doz uygulanmıştır. Konvansiyonel veriliş ve Nanosüspanse formülasyonlar incelenirken de Olaparib'in etkisi Tablo 3.1. ve Tablo 3.2.'de gösterildiği şekilde gruplar oluşturularak incelenmiştir.

Nihai gruplar tayin edilirken 24'lük kuyucuklarda yapılan doz çalışmalarında anlamlı bulunan ilk Olaparib dozu ile onun öncesi ve sonrasında eşlik eden dozlar baz alınmıştır. Nanoformülasyon ile geleneksel (konvansiyonel) formülasyon arasındaki fark da kıyaslanmıştır.

Tablo 3.1. Konvansiyonel verilişteki Olaparib grupları

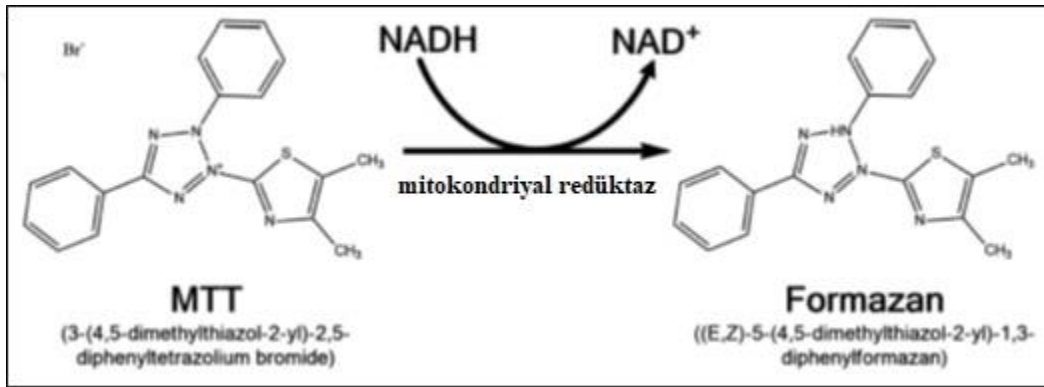
Gruplar	Konvansiyonel Form
KONTROL	DMEM İçeren Besiyeri
OKSİDATİF HASAR	30 µM H ₂ O ₂
POZİTİF KONTROL	100 µM Alfa Lipoik Asit (ALA)
TEDAVİ DOZU	30 µM H ₂ O ₂ + 100 µM ALA
TAŞIYICI	Dimetil sülfoksit (DMSO)
10 nM OLA	30 µM H ₂ O ₂ + 10 nM Olaparib
100 nM OLA	30 µM H ₂ O ₂ + 100 nM Olaparib
1 µM OLA	30 µM H ₂ O ₂ + 1 µM Olaparib
3 µM OLA	30 µM H ₂ O ₂ + 3 µM Olaparib
10 µM OLA	30 µM H ₂ O ₂ + 10 µM Olaparib
30 µM OLA	30 µM H ₂ O ₂ + 30 µM Olaparib
100 µM OLA	30 µM H ₂ O ₂ + 100 µM Olaparib

Tablo 3.2. Nanosüspansiyonla verilişteki Olaparib grupları

Gruplar	Nanosüspande Form
KONTROL	DMEM İçeren Besiyeri
OKSİDATİF HASAR	30 µM H ₂ O ₂
POZİTİF KONTROL	100 µM Alfa Lipoik Asit (ALA)
TEDAVİ DOZU	30 µM H ₂ O ₂ + 100 µM ALA
TAŞIYICI	Etkin Madde İçermeyen Boş Nanosüspansiyon
10 nM NOLA	30 µM H ₂ O ₂ + 10 nM Nanosüspande Olaparib
100 nM NOLA	30 µM H ₂ O ₂ + 100 nM Nanosüspande Olaparib
1 µM NOLA	30 µM H ₂ O ₂ + 1 µM Nanosüspande Olaparib
3 µM NOLA	30 µM H ₂ O ₂ + 3 µM Nanosüspande Olaparib
10 µM NOLA	30 µM H ₂ O ₂ + 10 µM Nanosüspande Olaparib
30 µM NOLA	30 µM H ₂ O ₂ + 30 µM Nanosüspande Olaparib
100 µM NOLA	30 µM H ₂ O ₂ + 100 µM Nanosüspande Olaparib

3.6. MTT ve MTS Testi ile Toksisite Değerinin Belirlenmesi

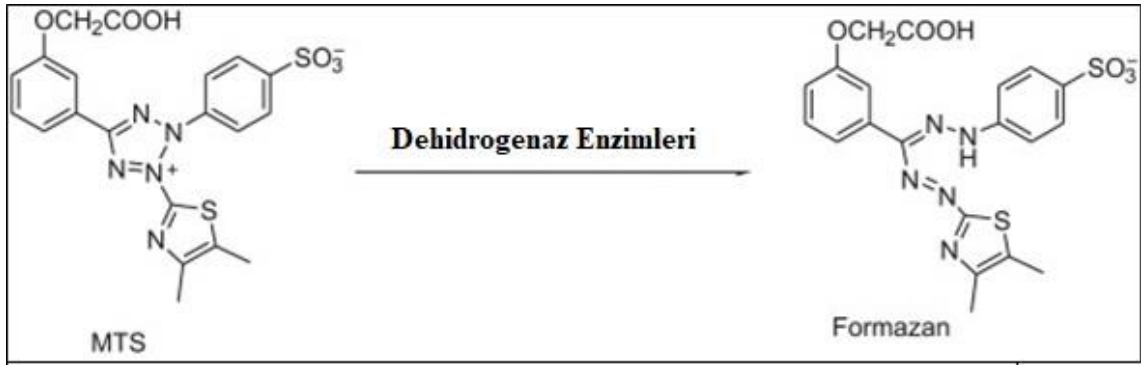
Hücrel metabolik aktivitenin ölçüldüğü testlerden biri 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testidir. Bu test yardımıyla hücre proliferasyonu ve sitotoksite hakkında bilgi sahibi olunmaktadır. Testin esası, proliferasyona uğrayan canlı hücrelerin mitokondrisinde bulunan dehidrojenaz enzimleri ile oluşan tetrazolyumun şelat oluşturarak mor renkli formazan kristallerine dönüşmesidir (Şekil 3.1). Suda çözünmeyen bu kristaller DMSO vasıtasıyla çözülünerek 570 nm’de absorbands dalga boyunda spektrofotometrik olarak tespit edilir. Ölçülen absorbandsın kuvveti ile değeri canlılıkla doğru orantılıdır (140, 141).



Şekil 3.1. Tetrazolyumun mitokondriyal aktivite ile formazana dönüşümü (141)

MTT’de oluşan ve doğrudan çözünebilir olmayan formazan kristalleri yerine son zamanlarda yeni bir tetrazolyum tuzu olan [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfopenil)-2H-tetrazolyum] MTS de tercih edilmeye başlanmıştır. Bu tuzun avantajı, kuyucuklardan sıvı alma basamağının ortadan kalkmasıdır. Bu durum zaman ve hücre kaybı gibi olası hataları ortadan kaldırmaya yardımcı olur. Ayrıca MTS’de hiçbir yıkama veya çözündürme basamağının olmayışı da canlı hücrelerin miktar tayinini daha hassas olarak ölçmeye olanak sağlamaktadır (142, 143).

Canlı hücrelerdeki dehidrojenaz enzimleri NAD(P)H’ye bağlı şekilde MTS tetrazolyum bileşiğini Şekil 3.2’deki reaksiyonda olduğu gibi meydana getirmektedir. Oluşan tuzlar 490-500 nm’de absorbands ölçülerek canlılık hakkında kantitatif veriler elde edilir.



Şekil 3.2. MTS'nin formazana enzimatik dönüşümü (142, 143)

SH-SY5Y nöroblastoma hatları 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde taze besiyeri ile süspansiyon haline getirilmiştir. Bu karışım belirli aralıklarla yavaş şekilde çalkalanarak homojen bir şekilde 96'lı kuyucuğun her bir kuyucuğa 100 μ l hücre içeren süspansiyonu ilave edilmiştir. Sonrasında 37°C ve %5 CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakılarak hatların yüzeye tutunmaları sağlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda belirlenen dozlarda Olaparib içeren besiyeri hazırlanıp ve eski besiyeri 96'lı kuyucuklardan uzaklaştırılarak yerine etkin madde içeren doz grupları uygulanmıştır.

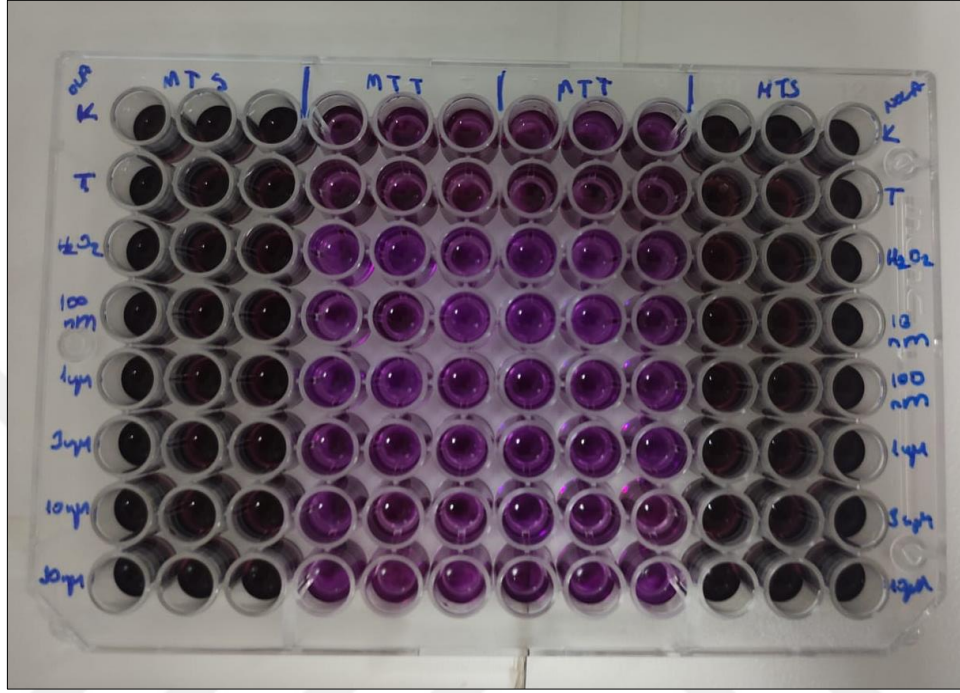
MTS ölçümü için hazır proliferasyon solusyonu (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corporation, ABD) kullanılmıştır. Supernatanttan ayrılan her bir kuyucuğa 10 μ l solüsyon konulup 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. 490 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır (Epoch, BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, ABD).

MTT ölçümü için 48 saat inkübasyona bırakılan hücrelerden önce süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından MTT (Sigma, St. Louis, MO, ABD) çözeltisinden 10 μ l/kuyucuk olacak şekilde kuyucuklara ilave edilerek plaklar ışık almayacak biçimde alüminyum folyo ile kapatılıp, etüvde 4 saat boyunca tekrar inkübasyona bırakılmıştır.

Bu süre sonunda MTT ve MTS deney esasınca oluşan formazan kristallerini gözlemlemek mümkündür. Oluşan bu kristalin renk şiddeti bize canlılık oranı hakkında fikir vereceğinden kantitatif ölçüm için bütün kuyucuklara Resim 3.3'te gösterildiği üzere %5'lik DMSO karışımı 100 μ l/kuyucuk olacak şekilde konulmuştur. Plaklar absorbans değerleri MTT için 570 nm, MTS için 490 nm dalga boyunda mikropalak okuyuculu spektrofotometre ile ölçülmüştür (Epoch, BioTek Instruments, Inc,

Winooski, VT, ABD). Her gruba ait absorbansın ortalama değeri (OD) alınarak % canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ canlılık} = [(\text{uygulama grubu OD değeri}) / (\text{kontrol grubu OD değeri})] \times 100$$



Resim 3.3. MTT ve MTS deneyi esnasında oluşan formazan kristalleri

3.7. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Sitotoksosite Testi

Laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi hücrelerde canlılığın ölçülmesinde sıkça kullanılan spektrofotometrik testlerden biridir. LDH tüm hücrelerin sitoplazmasında bulunan bir enzimdir. Ancak hücre herhangi bir hasara maruz kalırsa hücre dışına salınır ve böylece miktarı artar.

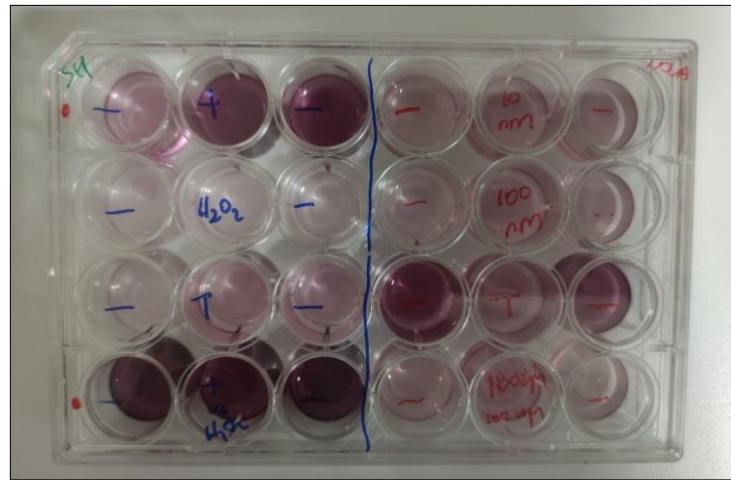
Kitte öncelikle LDH, laktatın pirüvata oksidasyonunu katalizleyerek NADH oluşturur. Ardından oluşan bu NADH, tetrazolium tuzu ile reaksiyona girerek sonuçta kırmızı-pembe bir renk meydana getirir. Deney, NADH varlığında, LDH'nin katalizlediği reaksiyon aracılığıyla piruvatın indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan rengin şiddetinin 490 nm'de kantitatif olarak ölçümü ise bize hasarın derecesi hakkında fikir verir. Çalışmamızda LDH sitotoksosite tayini için ELİSA kiti (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

SH-SY5Y hattını 5×10^5 hücre/ml yoğunluğunda içeren hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyon, 96 kuyucuklu plaklara 100 µl/kuyucuk olacak şekilde paylaştırılmıştır. Ardından %5 CO₂ içeren 37°C'deki inkübatörde 48 saat boyunca bekletilip, ardından supernatantlar plakalardan uzaklaştırılmıştır. Üzerine taze besiyeri içerisinde hazırlanan doz grupları uygulanıp 48 saat tekrar inkübe edilmiştir.

Tüm gruplarına ait supernatantlar toplanarak 10000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir (Eppendorf Centrifuge, 5810R, Merck, Darmstadt, Almanya). Santrifüj sonrası süpernatantlar 96 kuyucuklu plakaya her bir kuyucuğa 50 µl ilave edilip, üzerine 50 µl LDH reaksiyon tamponu konarak 45 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında 490 nm dalga boyunda mikropilaka okuyuculu spektrofotometrede absorbanslar ölçülmüştür (Epoch, BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, ABD).

3.8. Olaparib için Etkin Dozun Tespit Edilmesi

SH-SY5Y hücreleri 24'lü kuyucuklara hücre sayısı 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler 37°C ve %5 CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakılarak tutunmaları sağlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda belirlenen dozlarda Olaparib içeren besiyeri hazırlanmış ve eski besiyeri dökülerek hazırlanan karışım 24'lü kuyucuklara dağıtılmıştır. Deneye kontrol grubu olarak yalnızca besiyeri içeren kuyucuklar ile besiyeri/DMSO karışımı içeren kuyucuklar dâhil edilmiştir. Uygulama sonrasında MTT uygulanarak hücresel canlılık tayini Resim 3.4'te gösterildiği gibi yapılmıştır.



Resim 3.4. 30 µM H₂O₂'ye bağlı hücre hasarını farklı dozlarda Olaparib uygulaması sonucu canlılık miktarına etkisinin MTT ile incelenmesinden bir kesit

3.9. Nanoformülasyonun Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Düşük çözünürlüğe sahip etkin madde Olaparib'in olası hedefi SSS'dir. Bu nedenle limitasyonlarının giderilmesi amacıyla nanoformülasyonunun hazırlanarak geleneksel verilise göre kıyaslanmasının yapılması amacıyla Biruni Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndan destek alınmıştır. İlgili Anabilim Dalında Prof. Dr. İ. Tuncer Değim ve Dr. Öğretim Üyesi Gamze Çamlık'ın öngörüsü ile Olaparib'in nanosüspansiyonu hazırlanarak karakterizasyonları yapılmıştır.

Buharlaştırma tekniği ile Olaparib'in nanosüspansiyon formu hazırlanmıştır. Bunun için oda sıcaklığında iki ayrı beherde 10 ml etil alkol (EtOH) içerisine 650 mg Eudragit RS 100 ilave edilerek çözünmesi sağlandıktan sonra beherlerden birisine (A beheri) 50 mg Olaparib ilave edilmiştir. Diğer beher ise (B beheri) boş formülasyon olarak bırakılmıştır.

Hazırlanan A ve B beherleri manyetik karıştırıcıda 1000 rpm hızda dönmeye bırakılan % 0.02 Tween 80 içeren çözelti üzerine damla damla eklenmiştir. Nanopartiküllerin oluşmasını takiben 10 dk daha karıştırıcıda bırakılmıştır. Ardından Litesizer 500 (Anton Paar, Graz, Avusturya) cihazında partikül büyüklüğü ve dağılımı ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.10. Partikül Boyutu ve Dağılımının İncelenmesi

Hazırlanan nanosüspansiyonun partikül boyutu ölçümü Litesizer 500 (AntonPaar, Avusturya) cihazı yardımıyla gerçekleştirildi. Örnekler deneylerden önce partikül boyutu analizlerine tabi tutulmuş ve partikülsüz (süzülmüş) distile su ile 10-20 kat seyreltilmiştir.

3.11. Hücre Morfolojisinin Faz Kontrast Mikroskobu ile incelenmesi

SH-SY5Y hattının görüntülerini incelemek için H₂O₂ oksidatif stresi öncesi ve 48 saatlik stres sonrası faz kontrast inverted ışık mikroskobu (Leica, DM IL LED, Wetzlar, Almanya) kullanılarak 20X ve 40X'de görüntüleri incelenmiştir. Kontrol gruplarında adezyon ve canlılıkta bir sorun olmadığı gözlemlenmiştir.

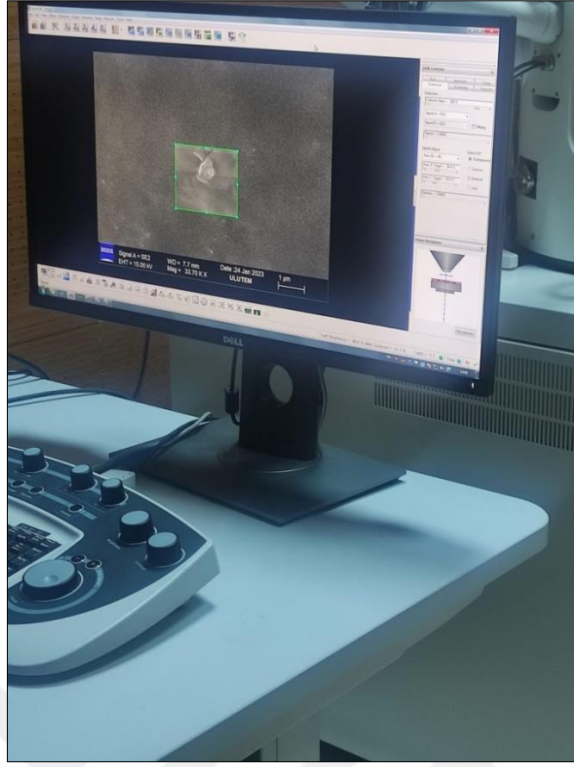
3.12. Taramalı Elektron Mikroskobu (*Scanning Electron Microscope, SEM*)

Analizi

Taramalı Elektron Mikroskobu (*Scanning Electron Microscope, SEM*), bir elektron mikroskobu türü olup, odaklanmış bir elektron demeti yollamak suretiyle incelenecek numunenin yüzeyini tarar. Böylelikle kompozisyon hakkında morfolojik inceleme imkanı sunar. Elde edilen sinyaller elektronların numunedeki atomlarla etkileşmelerinin ürünüdür. İlgili dedektörlerce toplanan bu sinyaller, cihazın ekranına aktarılarak üç boyutlu görüntü elde edilme imkanı sağlanır.

Çalışmamızda hazırlanan nanoformülasyon hakkında detaylı bilgi sahibi olabilmek için Gaziantep Üniversitesi Uluğ Bey Araştırma Merkezi'ndeki SEM cihazı kullanılmıştır. SEM'de görüntü alabilmek için, falkonlara alınan numuneler 3 defa serum fizyolojik ile 30'ar saniye yıkanmıştır. Sonrasında 10 ile 50 kat arası seyreltme uygulanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Numuneler kuruma işlemi bittikten sonra SEM incelemesine kadar desikatör içerisinde bekletilmiştir. İstenilen iletkenliğin sağlanabilmesi için 150 sn boyunca altın/paladyum (Au/Pd) kaplama materyali ile kaplanmıştır.

SEM incelemesi öncesi, örnekler pirinç taşıyıcılar üzerine yerleştirilmiştir. Gaziantep Üniversitesi Uluğ Bey Araştırma Merkezi'nde Resim 3.5 ve Resim 3.6'da gösterilen GeminiSem 300 (Zeiss, Oberkochen, Almanya) [cihazı ile görüntüler alınmıştır](#).



Resim 3.5. SEM’de görüntü alma ekranı



Resim 3.6.Zeiss Gemini Sem 300 cihazı

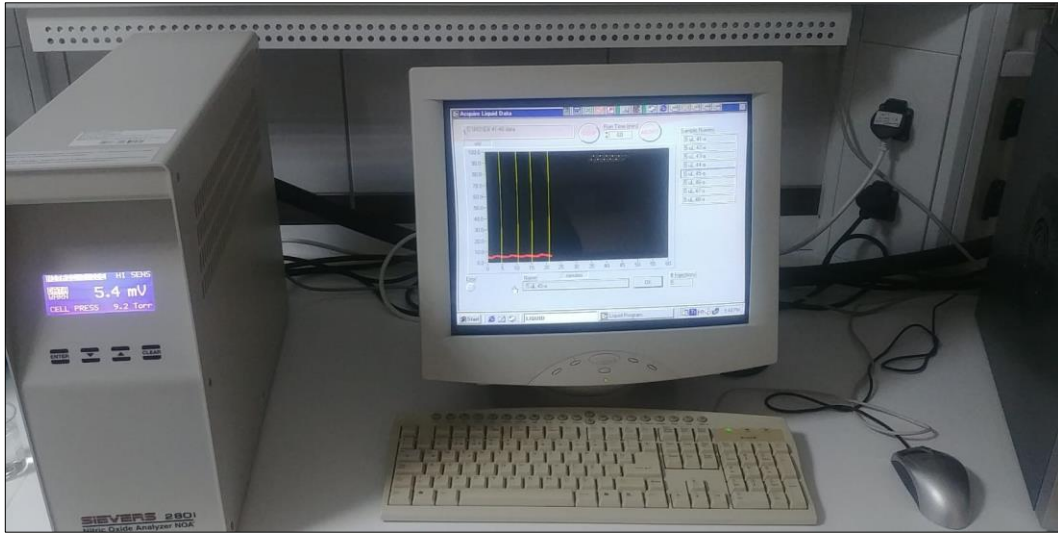
3.13. Nitrik Oksit (NO) Miktar Tayini

Nitrat ve nitrit, NO'nun birincil oksidasyon ürünleridir ve plazmadaki stabil nitrat/nitrit seviyeleri, genellikle NO oluşumunun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan teknik (NO/ozon kemilüminesans), nitrat/nitriti tekrar NO'ya çevirerek, NO seviyesini gaz fazında ölçmektedir.

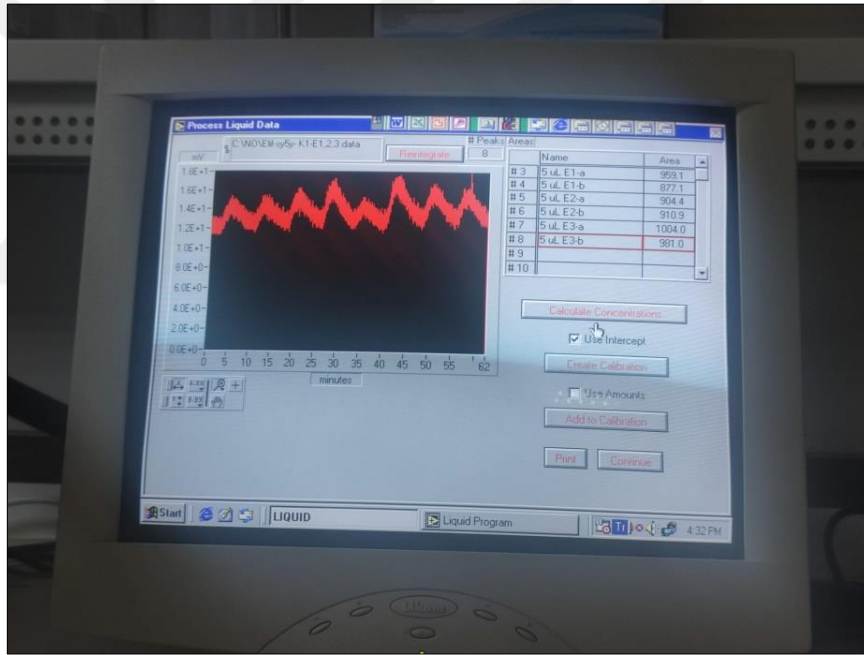


Resim 3.7. Reaksiyon ortamı haznesi

1500 g'de 10 dk santrifüj edilerek düz tüplere alınan ve analize kadar -80°C 'de saklanan numuneler, 0°C 'de mutlak etanol ile 1:2 h/h karışımında deproteinize edilerek, 30 dk boyunca 0°C 'de inkübe edilmiş, ardından 20800 g'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Pelletler atılarak ve süpernatant, NO/ozon kemilüminesans tekniği NO analyzer (Model 280i NOA, Sievers Instruments, Boulder, CO, ABD) cihazında NO düzeylerini ölçmek için kullanılmıştır. Nitrit, nitrat ve S-nitroso bileşiklerini NO'ya dönüştüren indirgeyici madde (95°C 'de 1 mol/L HCl'de çözünmüş vanadyum III klorür) ile reaksiyona girmek için numuneler ve standartlar sisteme enjekte edilmiştir (Resim 3.5). Sürekli bir saf azot akımı, elde edilen NO'yu reaksiyon ortamında kemilüminesans sinyali Resim 3.8 ve Resim 3.9'daki gibi ölçülmüştür. Numunenin NO konsantrasyonu, sodyum nitrat ile elde edilen standart eğriden yararlanılarak belirlenmiştir. Veri toplama ve analiz için NOAnalysis software (version 3.21, Sievers, Boulder, CO, ABD) kullanılmıştır.



Resim 3.8. Reaksiyon ortamında kemilüminesans sinyali



Resim 3.9. Reaksiyon ortamında kemilüminesans sinyalinin oluşturduğu pikler

3.14. SH-SY5Y Homojenatında Malondialdehit Testi

Malondialdehit (MDA) üç ve üzeri çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan bir bileşik olup, lipid peroksidasyonunun miktarı hakkında fikir veren bir parametredir.

Ölçüm için ELISA kiti (Solarbio, MDA kit BC0020, Beijing, Çin) kullanılmıştır. Nöron homojenatı 10000 g de 10 dk santrifüj edilip, kitin içeriğinde bulunan reajanlar sırasıyla uygulanmıştır. 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.15. SH-SY5Y Homojenatında Dinamik Tiyol/Disülfid Düzeyleri Ölçümü

Nöroblastoma hücre homojenatı örneklerindeki doğal tiyol (–SH) ve toplam tiyol (–SH + –S–S–) içeriği, Total Thiol Assay ve Native Thiol Assay kitleri (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçülmüştür. 96’lı kuyucuklarda yapılan deney için 10 µl Reagent 1 ve daha sonra her bir kuyucuğa 10 µl analiz edilecek örnekler ve grafik eldesi için kalibrasyon çözeltisi ve distile su eklenmiştir. Hafifçe karıştırılan mikrolaka 100 saniye oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklara 110 µl Reagent 2 eklenmiştir. Plaka hafifçe tekrar karıştırılıp 200 saniye oda sıcaklığında toplamda 5 dk’yı geçmeyecek kadar inkübe edilmiştir. 415 nm dalga boyunda ölçülen 1. absorbans değerleri kaydedilip, sonrasında hızlı bir şekilde kuyucuklara 10 µl Reagent 3 eklenmiştir. Tekrar hafifçe karıştırılıp 5dk inkübe edilen mikrolakaların 415 nm dalga boyunda 2. absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen 2. absorbans değeri ile 1. absorbans değeri arasındaki fark gerçek absorbans değeri olup bu değerler üzerinden lineer grafik ve denklem çıkartılarak numunelerdeki total tiyol konsantrasyonu µmol/L olarak hesaplanmıştır.

3.16. SH-SY5Y Homojenatında Nitrotirozin Düzeyi Ölçümü

Nitrotirozin düzeyi, Nitrotyrosine ELISA Kit (MBS807887, MyBioSource, Inc. San Diego, CA, ABD) kullanılarak ölçülmüş olup, mevcut nitrotirozin seviyelerinin göstergesi olan streptavidin peroksidaz emilimini 450 nm'de spektrofotometrik olarak Resim 3.10'de gösterildiği gibi ölçülmek suretiyle nitrotirozin düzeyi tespit edilmiştir (Epoch, BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, ABD).

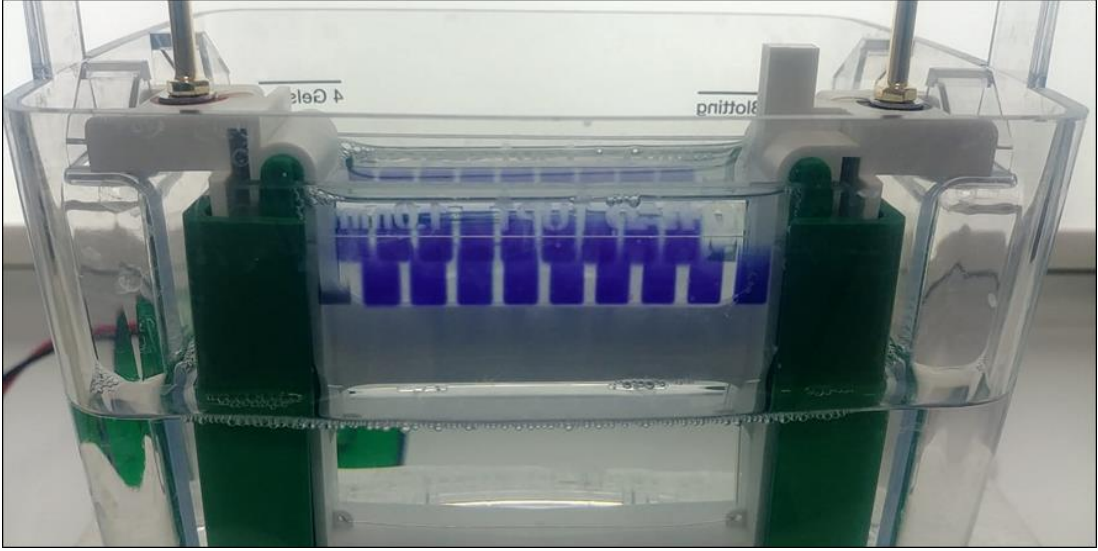


Resim 3.10. Spektrofotometrik ölçümü cihazı

3.17. Western Blot Analizi

SH-SY5Y nöroblastoma hattının pasajlamaları 6'lı kuyucuklarda yapılarak hücreler olgunlaşınca ilaç uygulaması yapılarak 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonra HEPES buffer ile hücre lizatı elde edilmiştir. Lizat hazırlamak için hücreler soğuk PBS ile yıkanarak, 3000 rpm'de +4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılarak pellet üzerine 200 µl HEPES buffer eklenmiştir. Pelletlerin çözünmesi sağlanarak 30 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Her 10 dk bir vorteksleme işlemi yapıp 10000 rpm +4°C'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısım yeni bir tüpe alınarak analiz için eşit parçalara bölünerek iki defa 30 sn süresince sonikatör ile (Sonopuls Bandelin, Berlin, Almanya) sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Süpernatant içeren homojenatlar 20800 g'de 10 dk santrifüje edilerek süpernatantlar alınmıştır. Süpernatant fraksiyonlarında mikropilaka spektrofotometrisi yöntemi kullanılarak (Take 3 Plate, Epoch, IL, ABD) protein miktarı ölçümü yapılmıştır. Protein

ölçümü yapıldıktan sonra kuyucuğa numune + 5 µl sample buffer + HEPES buffer konarak her kuyucuğa eşit protein olacak şekilde hesaplamalar yapılmıştır. 1 mm kalığında 10 kuyucuklu % 10'luk SDS-poliakrilamit jeller hazırlanmıştır. Süpernatantlar Laemli tamponu ile karıştırılarak Resim 3.11'de gösterildiği gibi 50 µg protein/kuyucuk olacak şekilde kuyucuklara örnekler ve protein marker (10-175 kDa) yüklenmiştir. Elektroforez tankına yerleştirilen jelle running buffer ile 1 saat 50 V ve 2 saat 80 V'da elektroforez işlemi uygulanmıştır. Jel boyutunda kesilen PVDF membran, metanol ile aktifleştirilmiştir. Sonrasında siyah filtre-ıslak beyaz Watman kağıdı-jel-membran-ıslak beyaz Watman kağıdı-siyah filtre olacak şekilde kasete yerleştirilmiştir. Jelden membrana proteinlerin geçmesi amaçlandığı için jel negatif uçta, membran pozitif uçta olacak şekilde yerleştirilmiştir. Tank transfer buffer ile doldurulup ve +4°C'de 25 V'da gece boyu ıslak transfer işlemi yapılmıştır. Transfer işlemi Ponceau boyaması ile kontrol edilmiştir. Ponceau kırmızısından kurtulmak için membran 3 kez 10 dk TBST (Tris Buffer Saline %0.05 Tween) ile yıkanmıştır. Renk kaybolduktan sonra membran %5 NFDM/TBST ile 1 saat oda sıcaklığında bloklama işlemi yapılmıştır. Bloklama işleminden sonra membran 3 kez 10 dk TBST ile yıkanmıştır. %3 BSA/TBST solüsyonu ile primer antikor (anti-PARP1 STJ97648, St John's Laboratory Ltd, Londra, İngiltere); %1 NFDM/TBST(anti-PARP2 STJ94959, St John's Laboratory Ltd, Londra, İngiltere) 1/1000 oranında dilüe edilmiştir. 10 µl/10 ml olacak şekilde membran +4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Yükleme kontrolü olarak beta aktin (sc-47778, Santa Cruz, Dallas, ABD) 1/1000 oranında TBST ile dilüe edilerek kullanılmıştır. Sabah oda sıcaklığında 3 kez 10 dk TBST ile yıkanmıştır. %3 BSA/TBST solüsyonu ile %1 NFDM/TBST (PARP2) sekonder antikor (goat anti-rabbit HRP, R-05072, Advansta Inc, San Jose, CA, ABD) 1/1000 oranında (10 µl/10 ml) ve sekonder antikor (anti-mouse HRP, sc-516102, Santa Cruz, Dallas, ABD) 1/1000 oranında dilüe edilerek membranlar oda sıcaklığında 1.5 saat inkübe edilmiştir. 3 defa 10'ar dk TBST ile yıkanmıştır. ECL primer ile kemilüminesans olarak bantlar görüntülenmiştir. Image J (1.52v) programı ile dansitometrik analiz yapılarak bantlar hakkında fikir sahibi olunmuştur.



Resim 3.11. Western Blot'ta hücre lizatlarını kuyucuklara yükleme işlemi

3.18. İstatistiksel Analiz

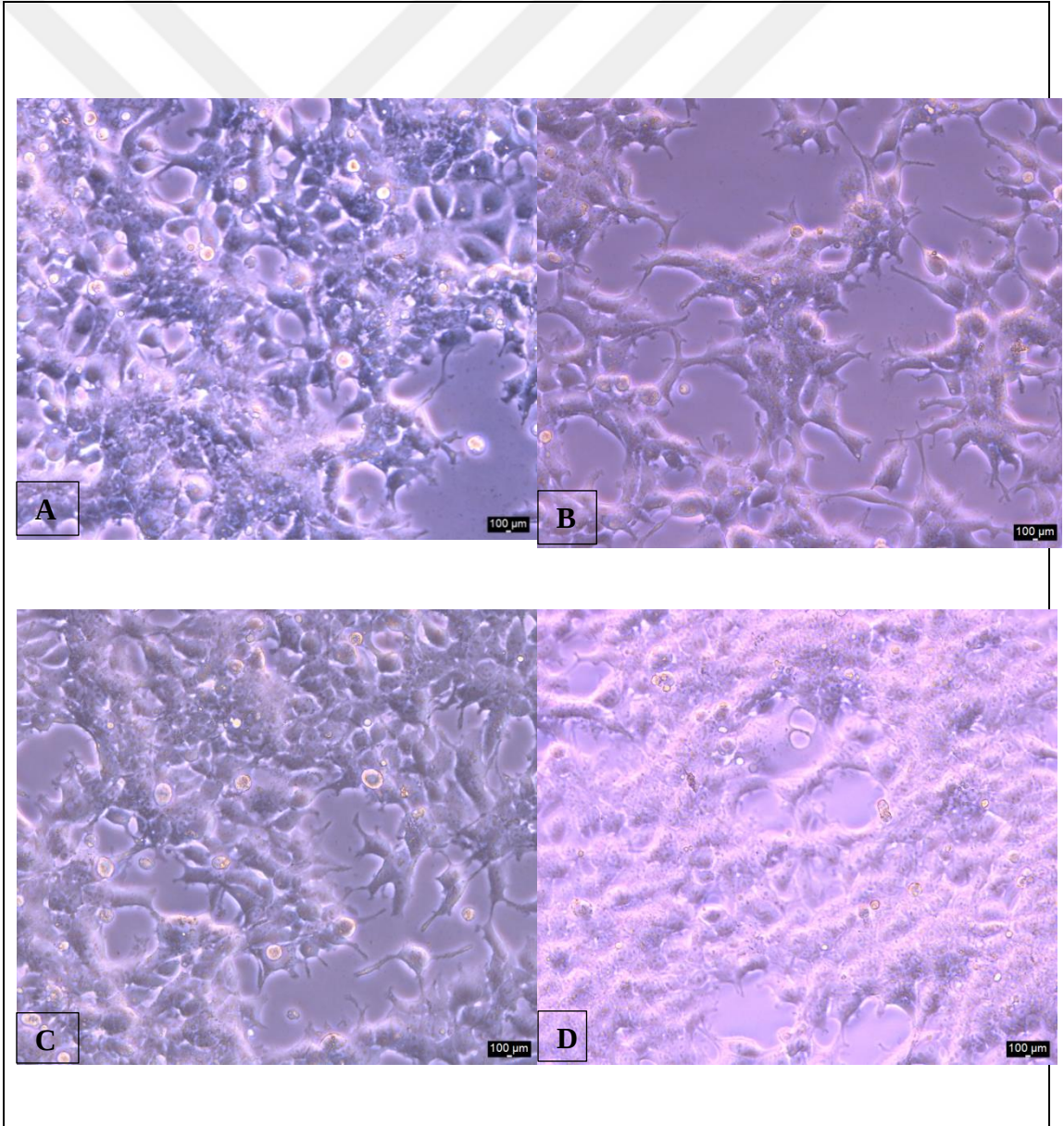
Tez çalışmamızda tüm deneylerin tekrar sayısı üçtür. Elde ettiğimiz verileri değerlendirmek için SPSS paket programı (SPSS Inc., versiyon 22.0, Chicago, IL, ABD) ve GraphPad InStat versiyon 3.05 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) kullanılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (S.D.) olarak belirtilmiştir. İstatistiksel anlamlılık değeri p iki yönlü olup, 0,05'den küçük olan değerler anlamlı bulunmuştur. Çalışmamızda iki grubun ortalamalarını karşılaştırırken eşleşmemiş Student t-testi, yüzdelerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanılmıştır. İki'den fazla grup ortalamalarının karşılaştırılmasında ANOVA devamında ise Student-Newman-Keuls veya Dunnett testi tercih edilmiştir. Değişkenlerin dağılımını Kolmogorov-Smirnov normalite testi aracılığıyla yapılmıştır ve hepsinin normal dağılıma uygun olduğu belirlenmiştir ($p > 0.1$).

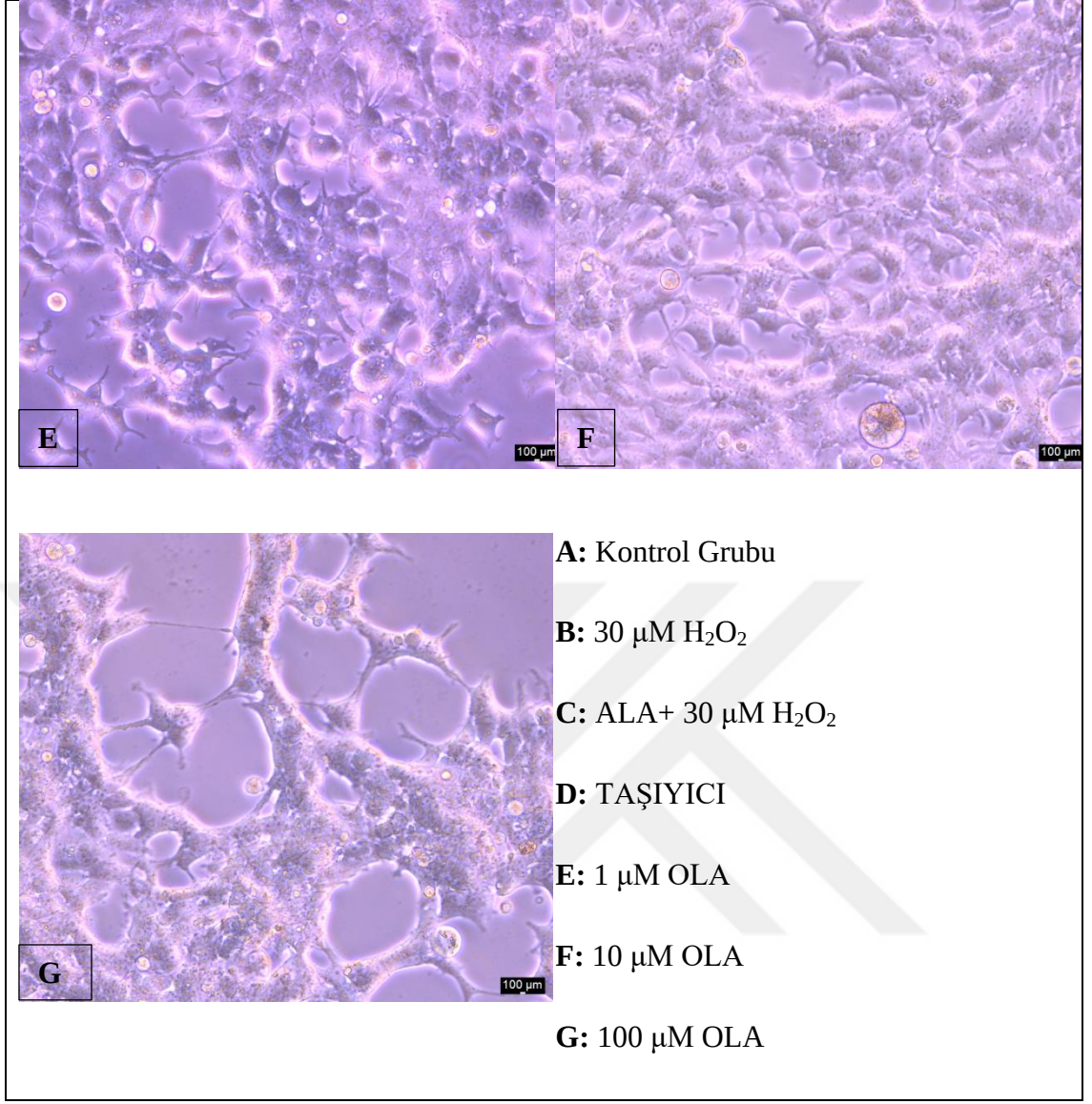
4. BULGULAR

4.1. Karakterizasyon Bulguları

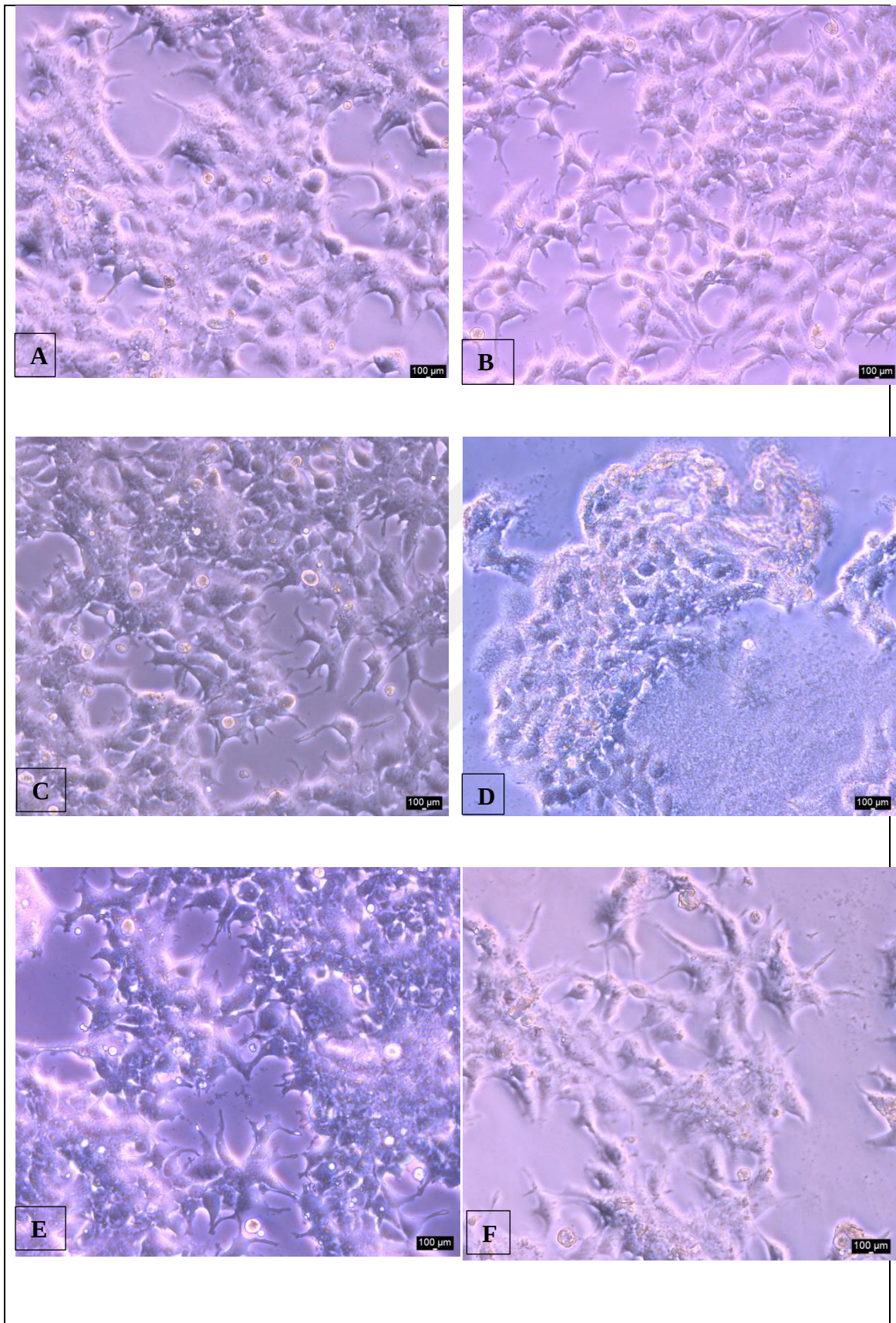
Çalışmada morfolojik incelemeler için faz kontrast mikroskobuna ait veriler Resim 4.1 ve Resim 4.2’de sunulmaktadır Görüntüler son ilaç uygulamasından 48 saat sonra alınmıştır. Bu verilere göre SH-SY5Y nöroblastoma hatlarının ilaç uygulamasına uygun proliferasyona ve hücre konfluensine sahip olduğu ve ilaç uygulaması sonrası hasar grubu ile negatif ve pozitif kontrol grupları arasında morfolojik farklılıklar olduğu gözlemlenebilir.

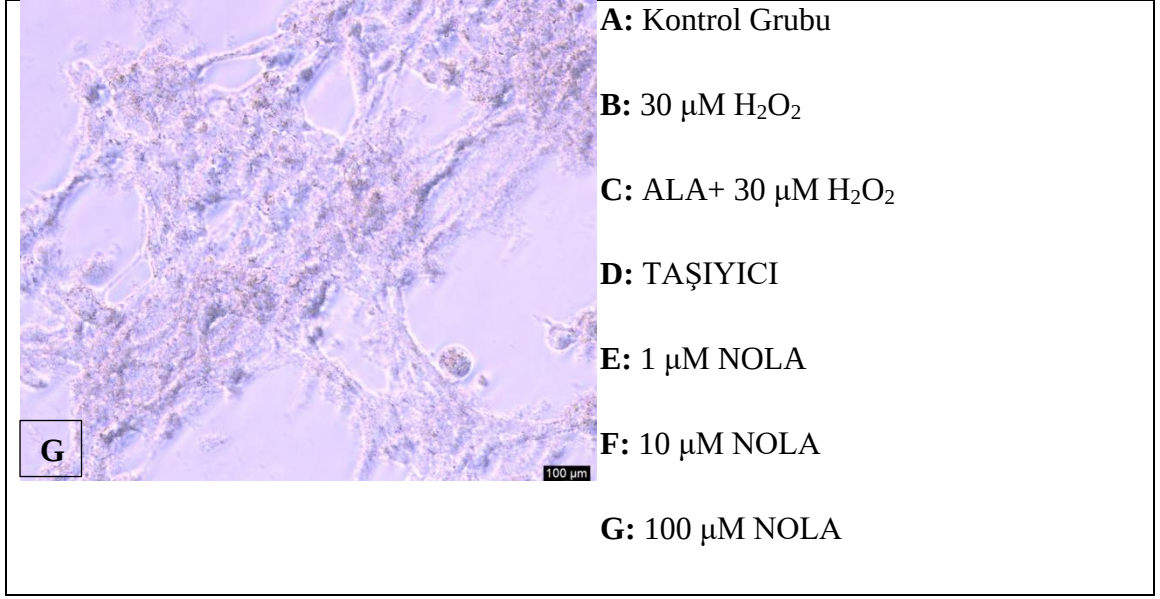
4.1.1. Faz Kontrast Mikroskobu görüntüleri





Resim 4.1. Olaparib içeren geleneksel verilmiş için faz kontrast görüntüleri

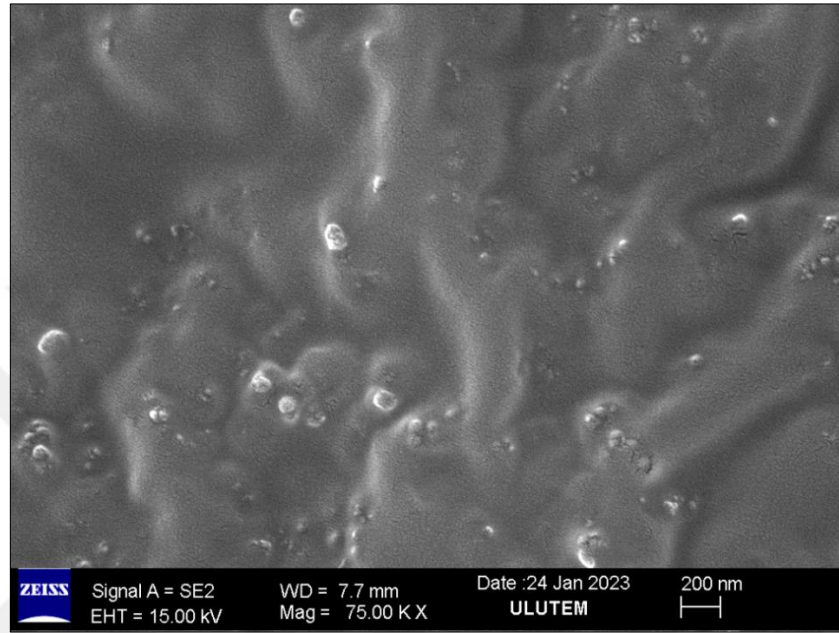




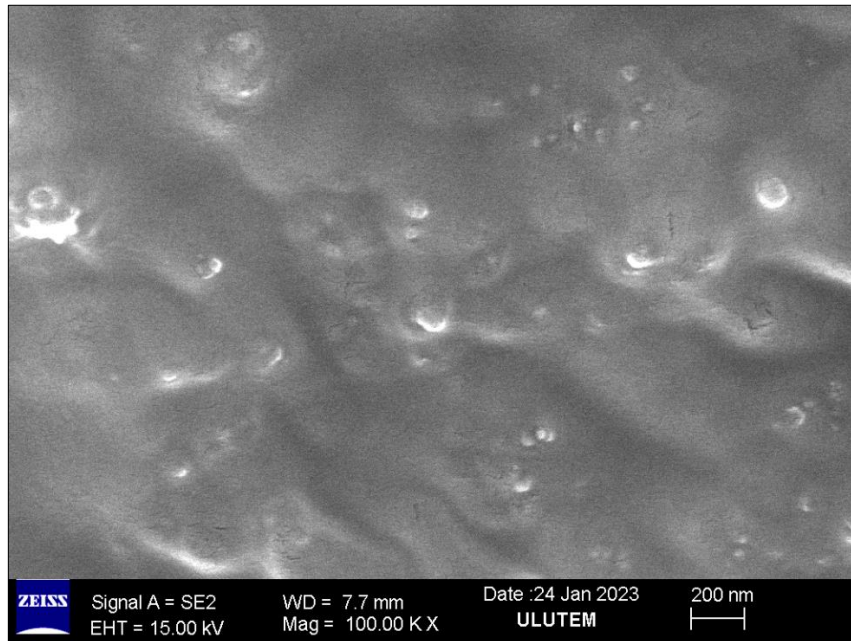
Resim 4.2. Olaparib içeren Nanosüspansiyon için faz kontrast görüntüleri

4.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (*Scanning Electron Microscope, SEM*) görüntüleri

SEM'e ait bulgular Resim 4.3 ve Resim 4.4'te gösterildiği gibidir. 200 nm ölçekte yapılan görüntülemeye göre partikül büyüklüğünün nano ölçeğe uygun olduğu görülmektedir.



Resim 4.3. Etkin madde içermeyen boş nanoformülasyona ait SEM görüntüsü



Resim 4.4. Nanosüspansiyonu hazırlanmış Olaparib'in SEM görüntüsü

4.2. Partikül Boyutu Ölçümü Bulguları

AntonPaar Litesizer 500 cihazında partikül büyüklüğü ve dağılımı ölçümleri gerçekleştirildi. Buna göre elde edilen ölçümler Tablo 4.1.ve Tablo 4.2’de gösterildiği gibidir.

Verilere göre partikül boyutları nano seviyede olup, dağılımları homojendir.

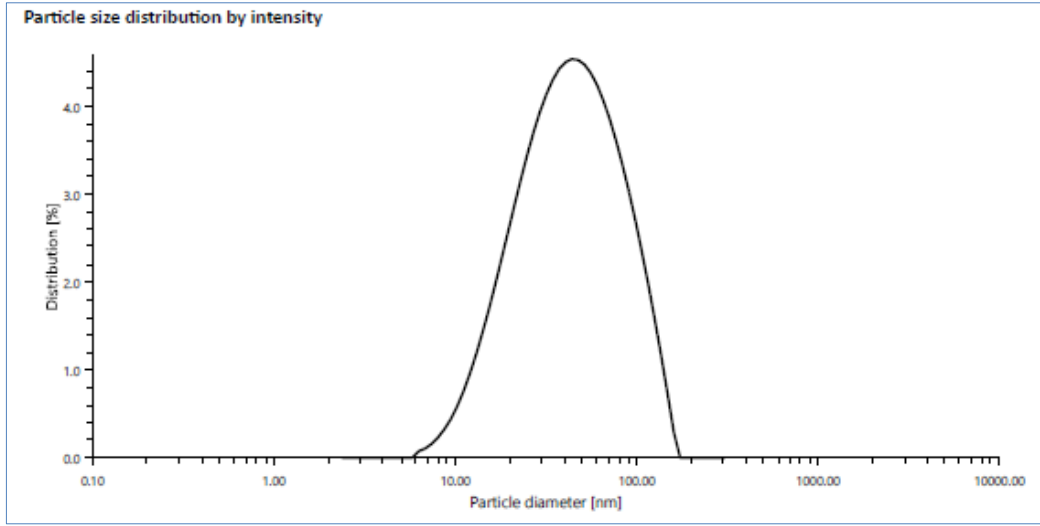
Tablo 4.1. Nanopartikül (NP) partikül boyut ve dağılımı

Partikül boyutu (nm)	PDI (%)
40.96	24.4
39.84	25.6
37.69	24.5
37.81	23.6
37.99	24.9
36.85	24.0
36.95	24.4
36.95	23.4
36.80	24.0
36.76	24.3
Ortalama $\pm$ SD: 37,86 $\pm$ 1,437	Ortalama $\pm$ SD: 24,31 $\pm$ 0,631

Tablo 4.2. Olaparib-Nanopartikül (OI-NP) partikül boyut ve dağılımı

Partikül boyutu (nm)	PDI (%)
37.75	25.3
37.32	26.2
40.17	24.2
40.38	24.9
38.66	25.2
38.41	23.9
39.48	24.8
37.76	24.4
39.84	25.9
37.98	24.5
Ortalama $\pm$ SD: 38,77 $\pm$ 1,11	Ortalama $\pm$ SD: 24,93 $\pm$ 0,733

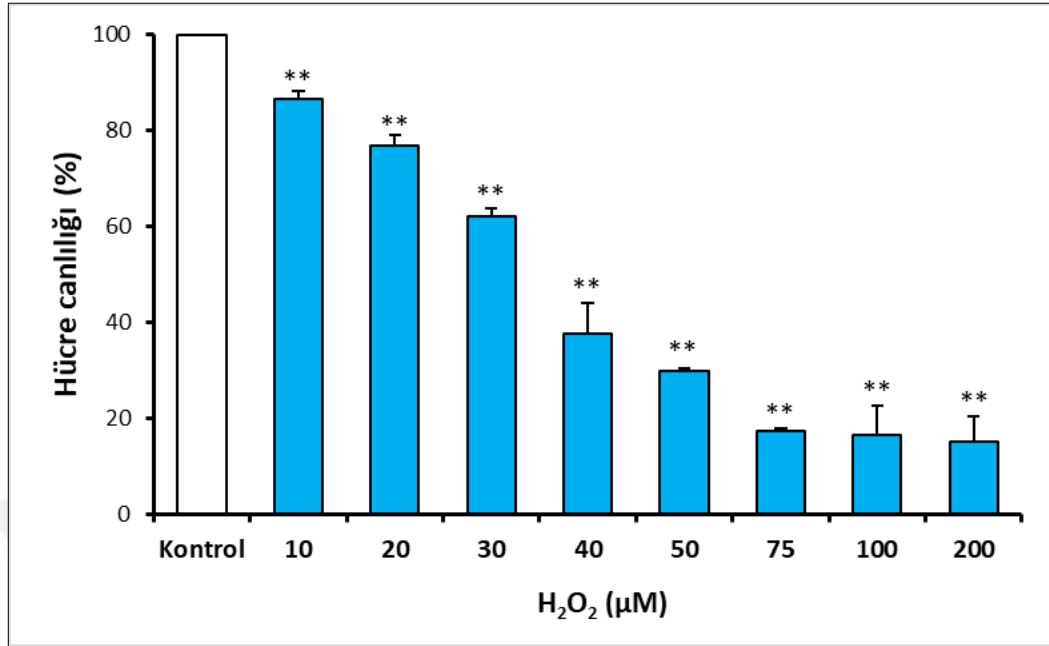
Olaparib içeren nanopartikül için partikül büyüklüğü dağılımı ölçümünden bir örnek Şekil 4.1’de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Olaparib içeren Nanosüspansiyon için partikül büyüklüğü dağılım ölçümü örneği

4.3. Biyokimyasal Bulgular

4.3.1. H₂O₂ Dozlarının belirlenmesine ait bulgular



Şekil 4.2. H₂O₂ uygulaması sonucu MTT canlılık testi

24 kuyucuklu plakalara 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, Olaparib (OLA) ve Nanoolaparib (NOLA) grupları arasında MTT sitotoksosite seviyeleri karşılaştırılmıştır. Veriler $\pm$ SD olarak verilmiştir ANOVA + Dunnett testi ile yapılan istatistiksel verilere göre $p < 0.01$ olarak hesaplanmıştır.

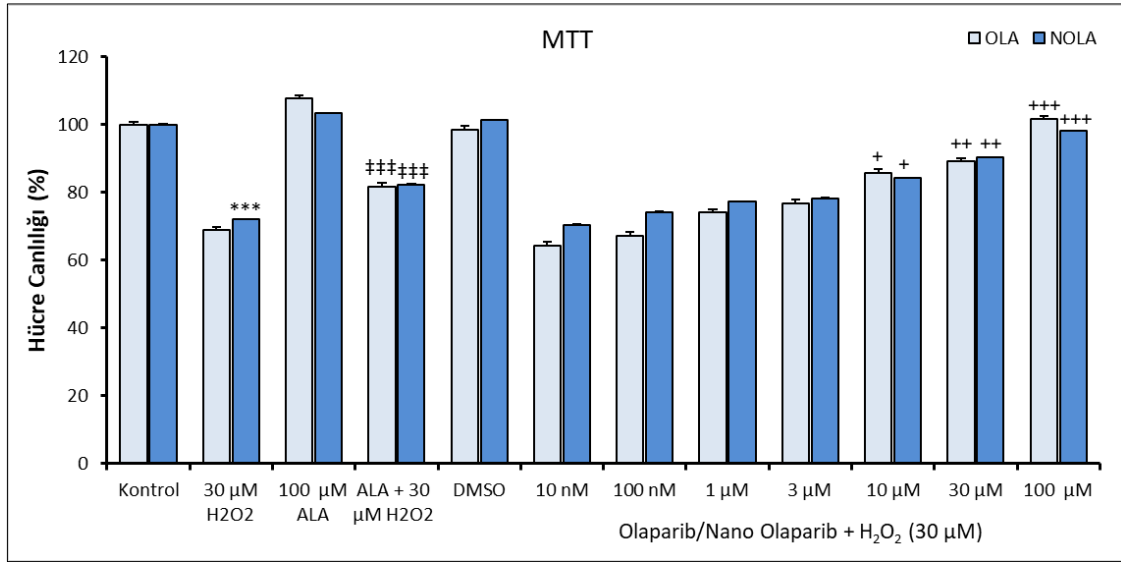
Tez çalışmamızda SH-SY5Y nöroblastoma hattında Olaparib'in etkisini araştırabilecek kadar hasarlı, canlılığı devam ettirecek kadar makul seviyede bir hasar elde etmek için H₂O₂ ile sıfırdan başlayarak 200 µM aralığına kadar konsantrasyonlarda uygulamalar yapıp, canlılık tayini sonuçları izlenmiştir. Uygulanan tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık yakalanmış olup ($p < 0.01$), çalışmamızda %70 oranında canlılık oluşturacak olan H₂O₂ konsantrasyonu 30 µM H₂O₂ olarak bulunmuştur ve çalışmanın devamında hasar oluşturma açısından bu konsantrasyon kullanılmıştır (Şekil.4.2).

4.3.2. MTT ve MTS Testi ile sitotoksosite incelemesi bulguları

Çalışmanın bu kısmında 30 µM H₂O₂ uygulanarak %70 canlılık sağlanan hasar gruplarına olası antioksidan ve/veya iyileştirici etki öngördüğümüz Olaparib'in sıfırdan başlanarak 10 nM, 100 nM, 1 µM, 3 µM, 10 µM ve 100 µM olmak üzere konsantrasyonlarda uygulaması yapılarak etkileri incelenmiştir.

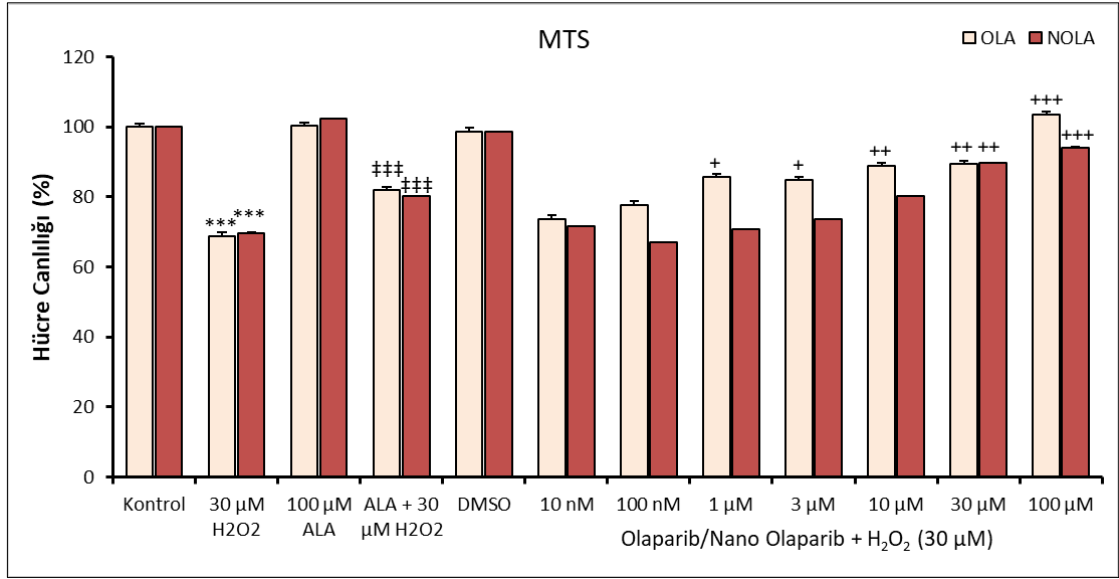
Burada tedavi grubu olarak alfa lipoik asitin (ALA) 100 μ M dozu seçilmiş ve Olaparib'in etkileri bu gruba göre kıyaslanmıştır.

Sitotoksitede meydana gelen değişimler MTT ve MTS olmak üzere iki farklı şekilde ölçülmüştür. Buradaki amaç hem sitotoksitede kıyaslamasında doğru sonuç elde etmek; hem de MTT ve MTS yöntemlerini kendi aralarında kıyaslamaktır.



Şekil 4.3. Hasar oluşturulan gruplara Olaparib uygulaması sonrası MTT ile sitotoksitede tespiti 24 kuyucuklu plakalara 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, Olaparib (OLA) ve Nanoolaparib (NOLA) grupları arasında MTT sitotoksitede seviyeleri karşılaştırılmıştır. Veriler $\pm$ SD olarak verilmiştir. *** $p < 0.001$ H₂O₂ ile Taşıyıcı ve Kontrol grupları karşılaştırıldığında, +++ $p < 0.001$ H₂O₂ ile ALA+H₂O₂ karşılaştırıldığında, + $p < 0.05$ H₂O₂ ile 10 μ M OLA ve NOLA karşılaştırıldığında, ++ $p < 0.01$ H₂O₂ ile 30 μ M OLA ve NOLA karşılaştırıldığında, +++ $p < 0.001$ H₂O₂ ile 100 μ M OLA ve NOLA karşılaştırıldığında

Buna göre MTT'de negatif kontrol grubu olarak tasarlanan 30 μ M H₂O₂ grubu kontrol ve taşıyıcı gruba göre hücre canlılığı açısından anlamlı derece ($p < 0.001$) düşük bulunmuştur. Tedavi grubu olarak tasarlanan 30 μ M H₂O₂ + 100 μ M H₂O₂ grubu, negatif kontrole göre sitotoksik açıdan anlamlı derecede ($p < 0.001$) olumlu etkiler göstermiştir. Olaparib uygulanan gruplara baktığımız zaman ise, 10 μ M OLA ve NOLA gruplarının negatif kontrole göre sitotoksik açıdan anlamlı derecede ($p < 0.05$) olumlu etkiler sergilediği görülmektedir. 30 μ M OLA ve NOLA grupları ile 100 μ M OLA ve NOLA gruplarının negatif kontrole göre sırasıyla anlamlı derecede $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ olumlu etkiler sergilediği Şekil 4.3'te görülmektedir.



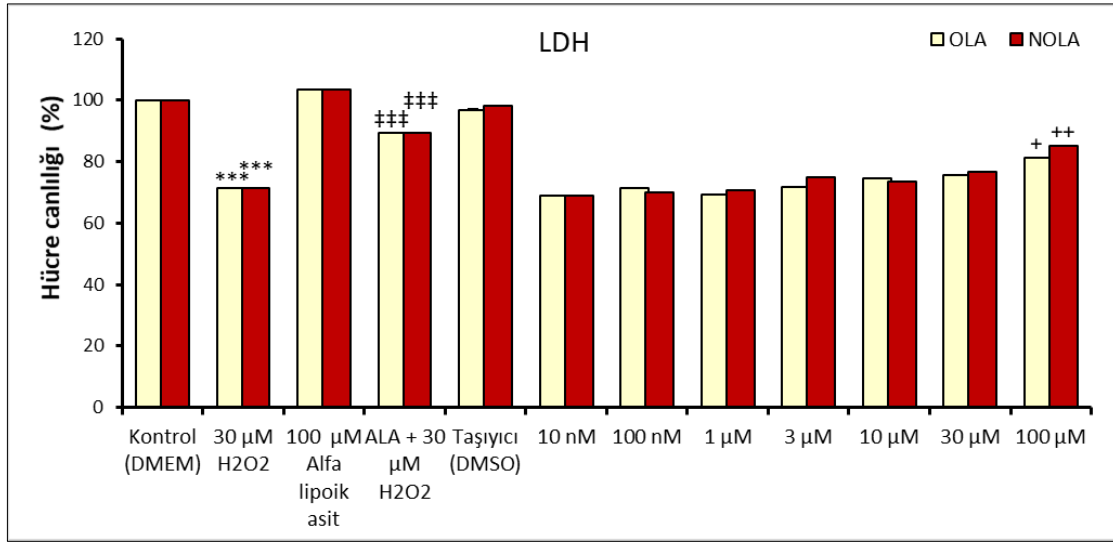
Şekil 4.4. . Hasar oluşturulan gruplara Olaparib uygulaması sonrası MTS sitotoksosite tespiti 24 kuyucuklu plakalara 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, Olaparib (OLA) ve Naonoolaparib (NOLA) grupları arasında MTS sitotoksosite seviyeleri karşılaştırılmıştır. Veriler $\pm$ SD olarak verilmiştir *** $p < 0.001$ H₂O₂ ile Taşıyıcı ve Kontrol grupları ayrı ayrı karşılaştırıldığında, ### $p < 0.001$ H₂O₂ ile ALA+H₂O₂ karşılaştırıldığında + $p < 0.05$ H₂O₂ ile 1 µM OLA ve 3 µM OLA ayrı ayrı karşılaştırıldığında, ++ $p < 0.01$ H₂O₂ ile 10 µM OLA karşılaştırıldığında, +++ $p < 0.001$ H₂O₂ ile 100 µM OLA ve 100 µM NOLA ayrı ayrı karşılaştırıldığında

MTS grubuna bakıldığında, sonuçların MTT grubu ile benzerlik taşıdığı Şekil 4.3'te görülebilmektedir. 30 µM H₂O₂ grubu hem taşıyıcı hem de kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında MTT'de olduğu gibi yüksek anlamlılık derecesine sahiptir ($p < 0.001$). ALA+ 30 µM H₂O₂ pozitif kontrol grubu da hasar grubuna göre yüksek anlamlılık derecesine sahiptir ($p < 0.001$). 10 µM, 30 µM, 100 µM OLA ve NOLA gruplarının da hasar grubuna kıyasla, tıpkı MTT'de olduğu gibi anlamlı seviyede yüksek canlılık yüzdesine sahip olduğu görülmüştür. MTS verilerinde MTT'den farklı olarak 1 µM ve 3 µM OLA dozlarında da hasar grubuna göre anlamlı derecede yüksek canlılık oranları olduğu, ancak buradaki anlamlılığın diğer gruplardan görece daha düşük seviyede ($p < 0,05$) olduğu Şekil 4.4'te görülmektedir.

4.3.3. Laktat Dehidrogenaz (LDH) sitotoksosite testi bulguları

LDH sitotoksosite testi bize SH-SY5Y hattında oluşan hücre zarı hasarını kantitatif olarak yansıtmaktadır. Test sonunda elde ettiğimiz bulgular yüzde olarak hesaplanmıştır.

Hesaplamalar sonucunda 100 μM OLA ve 100 μM NOLA grupları tıpkı tedavi grubu olarak tasarlanan 100 μM ALA+ 30 μM H_2O_2 gibi hasar grubu olan 30 μM H_2O_2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek canlılık oranına sahiptir. Tedavi grubunun anlamlılık oranı Olaparib’li olan gruplara nazaran daha yüksektir. İlgili veriler Şekil 4.5’te gösterilmiştir.

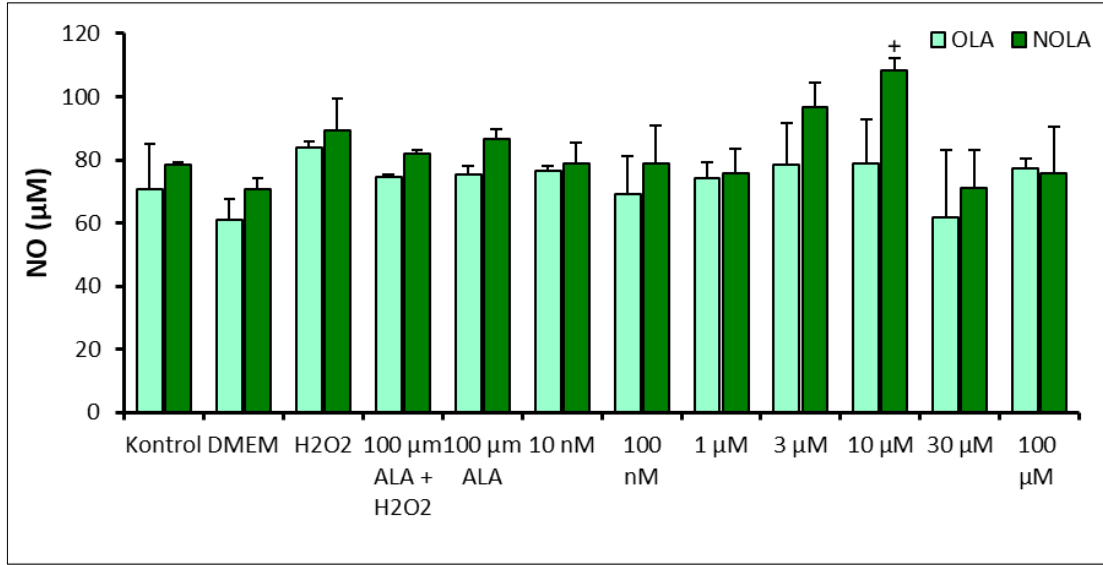


Şekil 4.5. OLA ve NOLA gruplarında LDH miktar tayini bulguları

24 kuyucuklu plakalara 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, Olaparib (OLA) ve Nanoolaparib (NOLA) grupları arasında LDH seviyeleri karşılaştırılmıştır. Veriler $\pm$ SD olarak verilmiştir. *** $p < 0.001$ H_2O_2 ile Taşıyıcı ve Kontrol ayrı ayrı karşılaştırıldığında, ††† $p < 0.001$ H_2O_2 ile ALA+ H_2O_2 karşılaştırıldığında, + $p < 0.05$ H_2O_2 ile 100 μM OLA karşılaştırıldığında, ++ $p < 0.01$ H_2O_2 ile 100 μM NOLA karşılaştırıldığında

4.3.4. NO miktar tayini bulguları

SH-SY5Y nöroblastoma hatlarına yapılan Olaparib ve Nanosüspanse Olaparib uygulamalarının farklı konsantrasyonlarda uygulaması yapıldıktan sonra, 48 saat sonra elde edilen supernatantlar toplanarak NO miktar tayini açısından değerlendirilmiştir. Buna göre elde edilen veriler Şekil 4.6’da olduğu gibidir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan tek grup 10 μM NOLA ile 30 μM H_2O_2 grupları arasındadır ($p < 0.05$).



Şekil 4.6. OLA ve NOLA gruplarında NO miktar tayini bulguları

24 kuyucuklu plakalara 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, OLA ve NOLA grupları arasında NO seviyeleri karşılaştırılmıştır. Veriler $\pm$ SD olarak verilmiştir + $p < 0.05$ H₂O₂ ile 10 µM NOLA karşılaştırıldığında

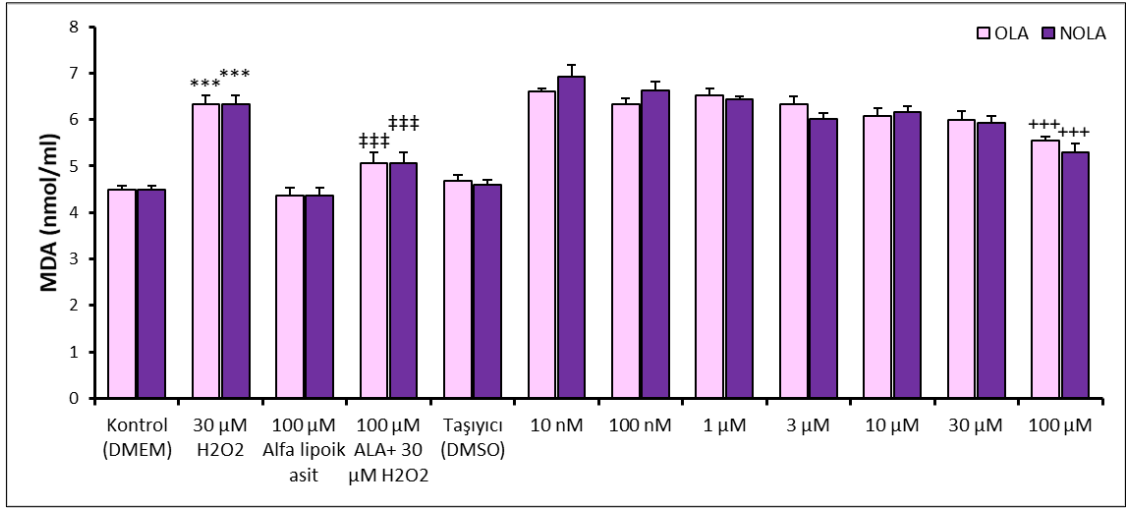
4.3.5. SH-SY5Y Homojenatında Malondialdehit ölçümü bulguları

SH-SY5Y nöroblastoma hattında doz uygulamaları sonrası nöroblastoma homojenatlarında yapılan MDA ölçümleri sonuçları Şekil 4.7’de olduğu gibi olup, bazı gruplar arasında anlamlı farklılıklara rastlanmıştır.

ANOVA + Student Newman-Keuls testine göre 30 µM H₂O₂ ile hem kontrol hem de taşıyıcı gruplar arasında anlamlı derece yüksek MDA seviyelerine sahiptir ($p < 0.001$).

Negatif kontrol grubu olan 30 µM H₂O₂ ile pozitif kontrol grubu olan 30 µM H₂O₂ + 100 µM ALA grupları arasında da anlamlı fark ($p < 0.001$) olup, 30 µM H₂O₂ + 100 µM ALA grubunda daha düşük MDA seviyeleri ölçülmüştür (Şekil 4.7).

100 µM NOLA grubu ile 30 µM H₂O₂ grubu arasında anlamlı derecede düşük MDA seviyelerine ulaşıldığı tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

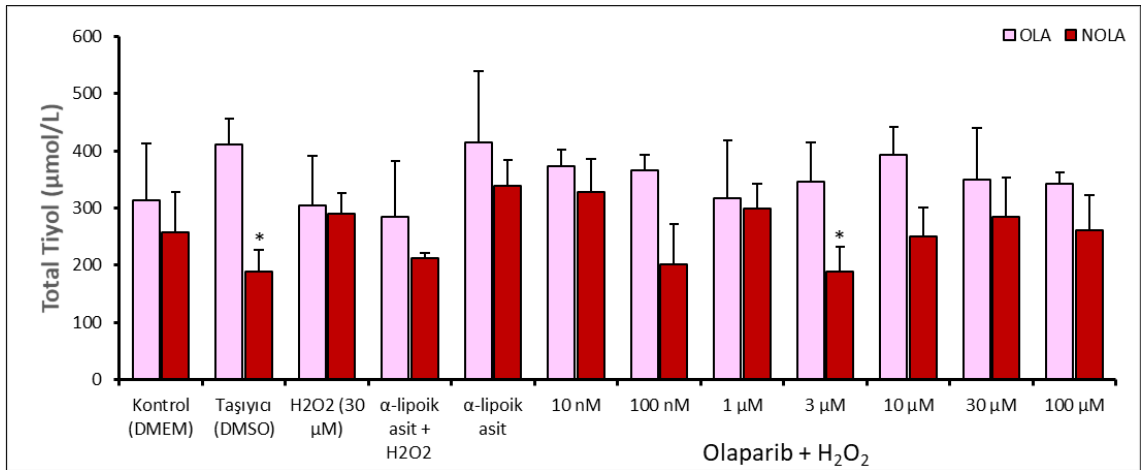


Şekil 4.7. OLA ve NOLA gruplarında MDA miktar tayini bulguları

24 kuyucuklu plakalara 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, Olaparib (OLA) ve Nanoolaparib (NOLA) grupları arasında MDA seviyeleri karşılaştırılmıştır. Veriler $\pm$ SD olarak verilmiştir. ANOVA + Student Newman-Keuls testine göre;*** $p < 0.001$ H₂O₂ ile Taşıyıcı ve Kontrol grupları ayrı ayrı karşılaştırıldığında, +++ $p < 0.001$ H₂O₂ ile ALA+H₂O₂ grubu karşılaştırıldığında, ++++ $p < 0.001$ H₂O₂ ile 100 μ M NOLA karşılaştırıldığında

4.3.6. SH-SY5Y Homojenatında dinamik Tiyol/Disülfid düzeyleri ölçümü

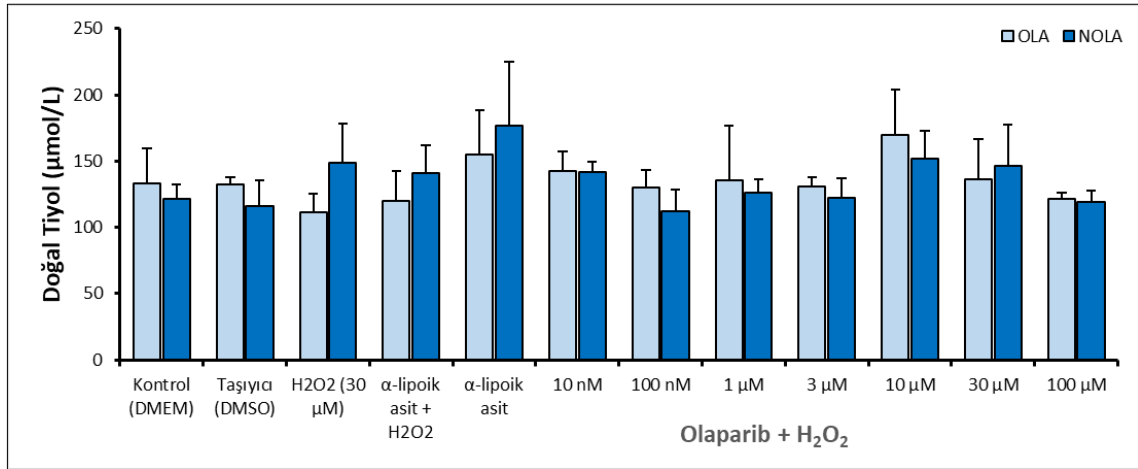
SH-SY5Y Homojenatında dinamik tiyol/disülfid düzeyi ölçümü sonuçlarına ait çalışma verilerine baktığımızda total tiyol miktar tayini için 3 μ M NOLA grubu aynı dozda OLA ile kıyaslandığında anlamlı seviyede düşük bulunmuştur. Benzer anlamlılık NOLA taşıyıcı grubu ile OLA arasında da görülmektedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. OLA ve NOLA gruplarında total tiyol miktar tayini bulguları

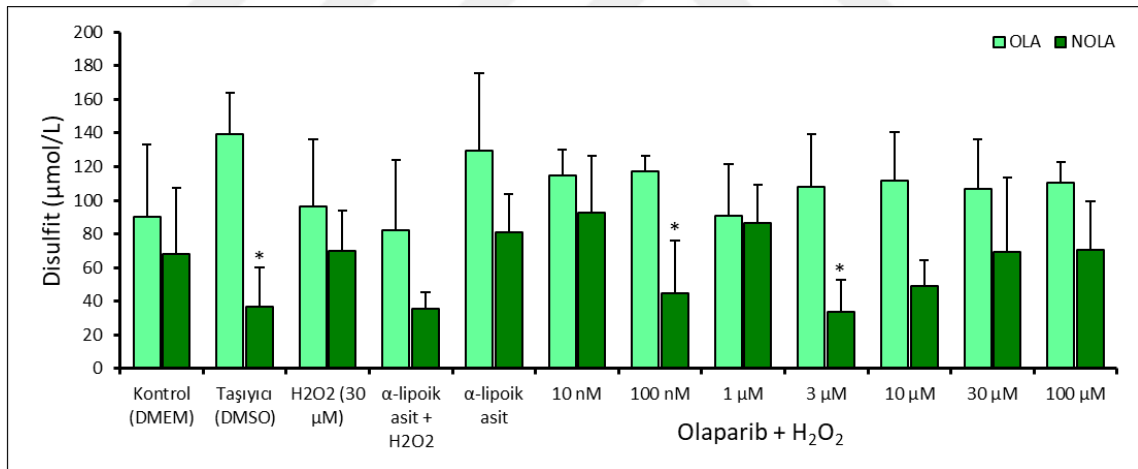
96 kuyucuklu plakalara en az 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, Olaparib (OLA) ve Nanoolaparib (NOLA) grupları arasında total tiyol seviyeleri karşılaştırılmıştır. Veriler $\pm$ SD olarak verilmiştir. ANOVA + Student Newman-Keuls testine göre * $p < 0.05$ grup içi OLA grupları ile karşılaştırıldığında

Doğal tiyol seviyelerine baktığımızda grup içi ve gruplar arası anlamlılık bulunamamıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. OLA ve NOLA gruplarında doğal tiyol miktar tayini bulguları

96 kuyucuklu plakalara en az 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, Olaparib (OLA) ve Nanoolaparib (NOLA) grupları arasında total tiyol seviyeleri karşılaştırılmıştır. Veriler $\pm$ SD olarak verilmiştir. ANOVA + Student Newman-Keuls testi

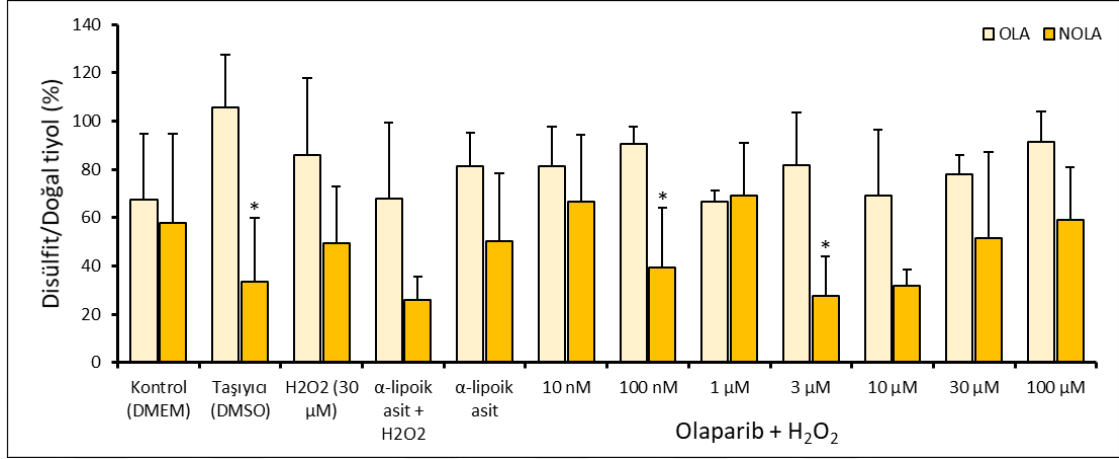


Şekil 4.10. OLA ve NOLA gruplarında disülfid miktar tayini bulguları

96 kuyucuklu plakalara en az 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, Olaparib (OLA) ve Nanoolaparib (NOLA) grupları arasında total tiyol seviyeleri karşılaştırılmıştır. Veriler $\pm$ SD olarak verilmiştir. ANOVA + Student Newman-Keuls testine göre * $p < 0.05$ grup içi OLA ile karşılaştırıldığında

Disülfid seviyelerinin 100 nM NOLA grubu ve 3 µM NOLA grubunda aynı doz OLA grubuna kıyasla anlamlı seviyede düşük olduğu görülmektedir. Benzer durum NOLA'da taşıyıcı grup için de bulunmuştur (Şekil 4.10).

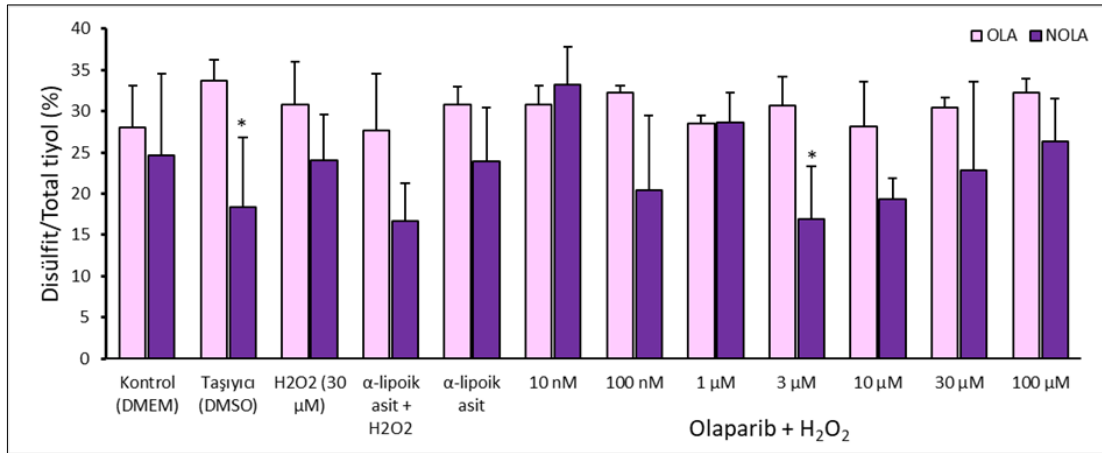
Disülfid ile doğal tiyol grupları arasındaki oranın, NOLA gruplarının 100 nM, 3 µM ve taşıyıcı gruplarında OLA'ya kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. OLA ve NOLA gruplarında disülfid/doğal tiyol oranı bulguları

96 kuyucuklu plakalara en az 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, Olaparib (OLA) ve Nanoolaparib (NOLA) grupları arasında total tiyol seviyeleri karşılaştırılmıştır. Veriler ±SD olarak verilmiştir. ANOVA + Student Newman-Keuls testine göre *p<0.05 grup içi OLA ile karşılaştırıldığında

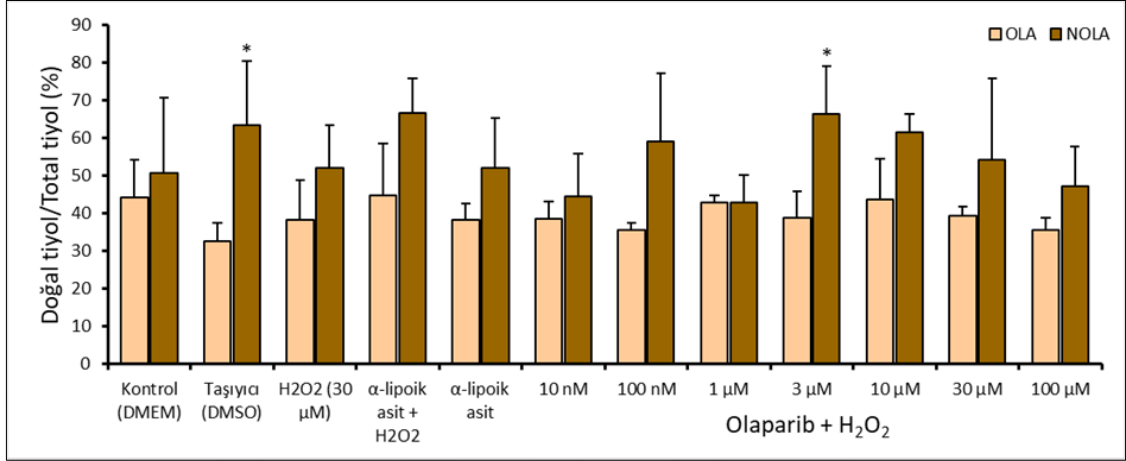
Disülfid ile total tiyol grupları arasındaki oranın, NOLA gruplarının 3 µM ve taşıyıcı gruplarında OLA'ya kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. OLA ve NOLA gruplarında disülfid/total tiyol oranı bulguları

96 kuyucuklu plakalara en az 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, Olaparib (OLA) ve Nanoolaparib (NOLA) grupları total tiyol seviyeleri karşılaştırılmıştır. Veriler ±SD olarak verilmiştir. ANOVA + Student Newman-Keuls testine göre *p<0.05 grup içi OLA ile karşılaştırıldığında

Doğal tiyol ile total tiyol grupları arasındaki oranın, NOLA gruplarının 3 μ M ve taşıyıcı gruplarında OLA'ya kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu Şekil 4.13'te gösterilmiştir.

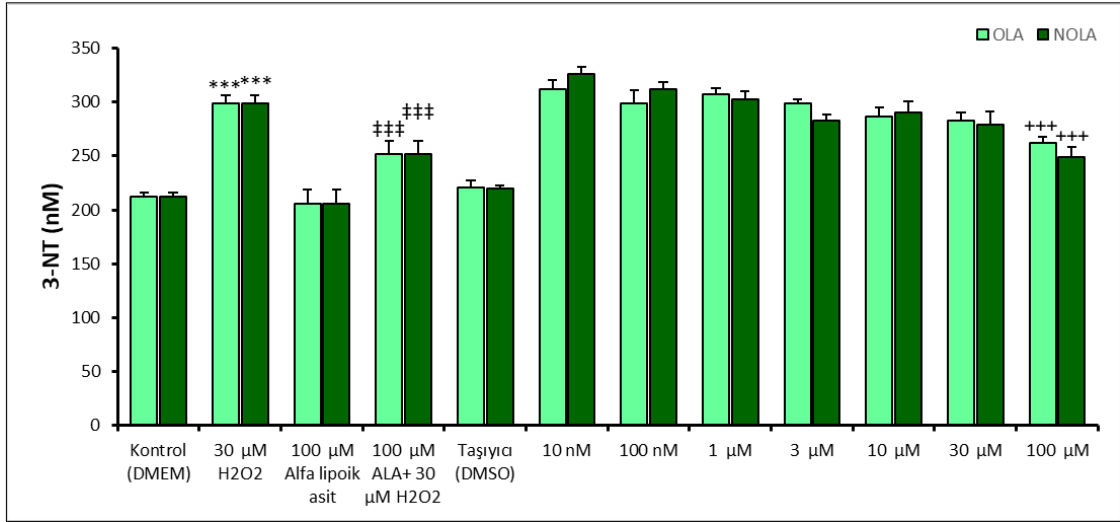


Şekil 4.13. OLA ve NOLA gruplarında doğal tiyol/total tiyol oranı bulguları

96 kuyucuklu plakalara en az 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, Olaparib (OLA) ve Nanoolaparib (NOLA) grupları arasında total tiyol seviyeleri karşılaştırılmıştır. Veriler $\pm$ SD olarak verilmiştir. ANOVA + Student Newman-Keuls testine göre * $p < 0.05$ grup içi OLA ile karşılaştırıldığında

4.3.7. SH-SY5Y Homojenatında Nitrotirozin düzeyi ölçümü bulguları

SH-SY5Y Homojenatında nitrotirozin düzeyi ölçümü sonuçlarına ait çalışma verileri Şekil 4.14'te olduğu gibi olup, bazı gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Buna göre kontrol grubu ile hasar grubu, kontrol grubuyla taşıyıcı grup arasında anlamlı fark bulunmuştur. 30 μ M H_2O_2 + 100 μ M ALA grubunun 3-NT seviyesinin 30 μ M H_2O_2 grubu ile kıyaslandığında; anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Yine 100 μ M OLA ve NOLA gruplarının her ikisi 30 μ M H_2O_2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük 3-NT seviyelerine sahiptir.



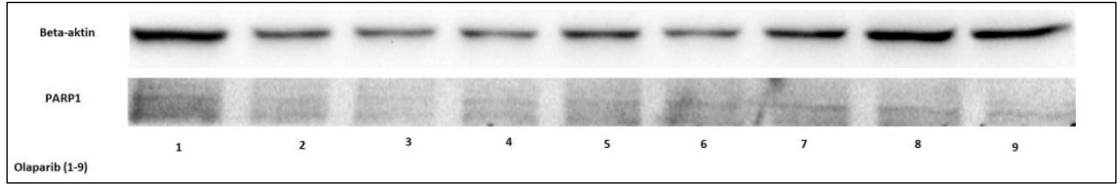
Şekil 4.14. OLA ve NOLA gruplarında 3-NT miktar tayini bulguları

24 kuyucuklu plakalara 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, Olaparib (OLA) ve Nanoolaparib (NOLA) grupları arasında 3-NT seviyeleri karşılaştırılmıştır. Veriler $\pm$ SD olarak verilmiştir. *** $p < 0.001$ H₂O₂-Taşıyıcı-Kontrol; ### $p < 0.001$ H₂O₂ ile ALA+H₂O₂ karşılaştırıldığında; +++ $p < 0.001$ H₂O₂ ile 100 µM OLA ve NOLA ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında

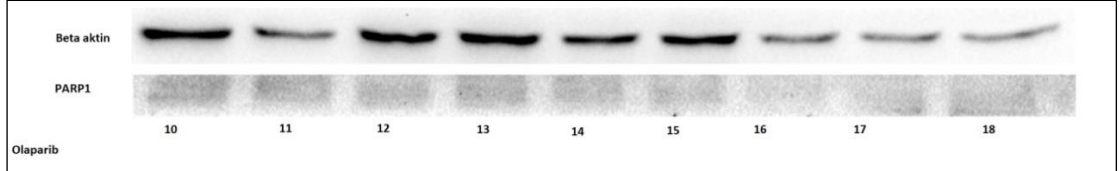
4.3.8. Western Blot Bulguları

Geleneksel yolla ve Nanosüspansiyonla uygulanan Olaparib dozlarından sonra nöroblastoma homojenatları toplanarak PARP-1 ve PARP-2 enzimi açısından Western Blota tabi tutulmuştur.

OLA-PARP1 enzim ekspresyonu sonuçlarına ait bant görüntüleri Resim 4.5 ve Resim 4.6'da gösterildiği gibi olup, ölçüm yapılan gruplar Şekil 4.15'de gösterilmektedir. Buna göre Şekil 4.16'da gösterildiği gibi OLA gruplarından sadece 100 µM OLA ile 30 µM H₂O₂ arasında PARP-1 enzimi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur.



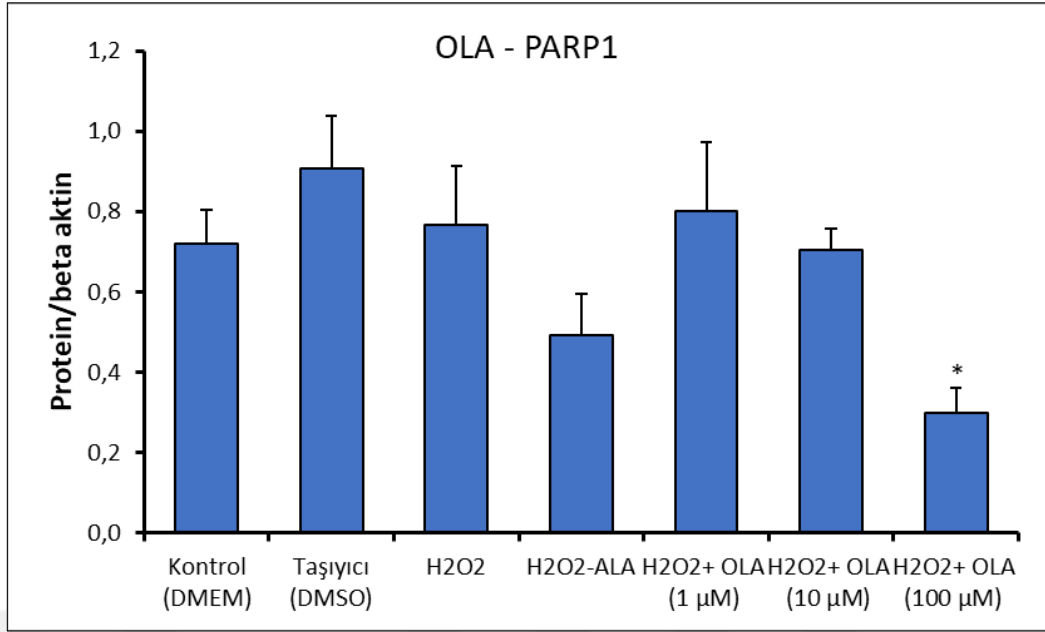
Resim 4.5. OLA-PARP-1 Bant görüntüsü
1,2:Kontrol; 2,3:Taşıyıcı; 4-6: H₂O₂; 7-9: H₂O₂+ALA



Resim 4.6. OLA-PARP-1 Bant görüntüsü diğer gruplar
10-12: H₂O₂+OLA (1 µM); 13-15: H₂O₂+OLA (10 µM); 16-18: H₂O₂+OLA (100 µM)

	OLA-PARP-1	β-aktin
Kontrol		
Taşıyıcı (DMSO)		
H₂O₂		
H₂O₂+ALA		
H₂O₂+OLA (1 µM)		
H₂O₂+OLA (10 µM)		
H₂O₂+OLA (100 µM)		

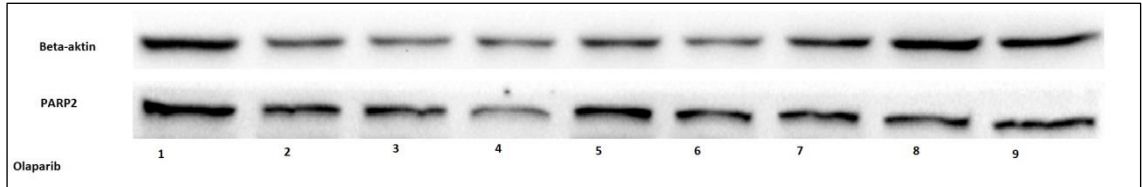
Şekil 4.15. OLA grubu PARP-1 Western Blot analizi örnek bant görüntüleri



Şekil 4.16. OLA gruplarında PARP-1 Western Blot sonuçları

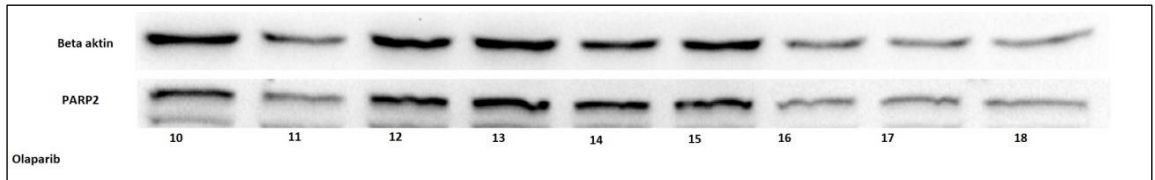
24 kuyucuklu plakalara en az 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, OLA grupları arasında PARP-1 enzim ekspresyonu seviyeleri karşılaştırılmıştır. Veriler $\pm$ SD olarak verilmiştir. * $p < 0.05$ H_2O_2 ile H_2O_2 +OLA 100 μ M kıyaslandığında

OLA-PARP2 enzim ekspresyonu sonuçlarına ait bant görüntüleri Resim 4.7 ve Resim 4.8’de gösterildiği gibidir.



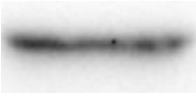
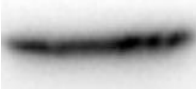
Resim 4.7. . OLA-PARP-2 Bant görüntüsü

1,2:Kontrol; 2,3:Taşıyıcı; 4-6: H_2O_2 ; 7-9: H_2O_2 +ALA



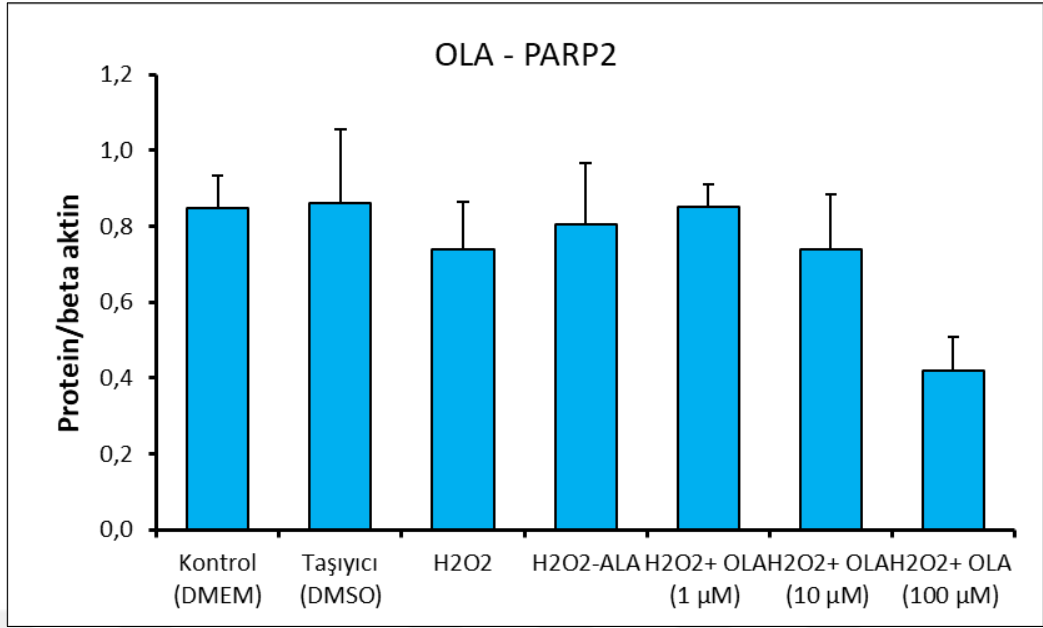
Resim 4.8. OLA-PARP-2 Bant görüntüsü diğer gruplar

10-12: H_2O_2 +OLA (1 μ M); 13-15: H_2O_2 +OLA (10 μ M); 16-18: H_2O_2 +OLA (100 μ M)

	OLA-PARP-2	β -aktin
Kontrol		
Taşıyıcı (DMSO)		
H₂O₂		
H₂O₂+ALA		
H₂O₂+OLA (1 μM)		
H₂O₂+OLA (10 μM)		
H₂O₂+OLA (100 μM)		

Şekil 4.17. OLA grubu PARP-2 Western Blot analizi örnek bant görüntüleri

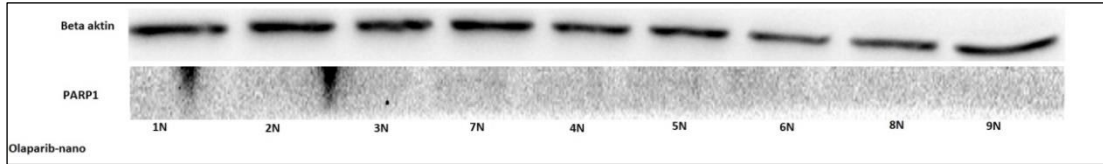
OLA-PARP2’de ölçüm yapılan gruplar Şekil 4.17’de gösterilmektedir. Buna göre OLA gruplarından hiçbirinde PARP-2 enzimi açısından anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. OLA gruplarında PARP-2 Western Blot sonuçları

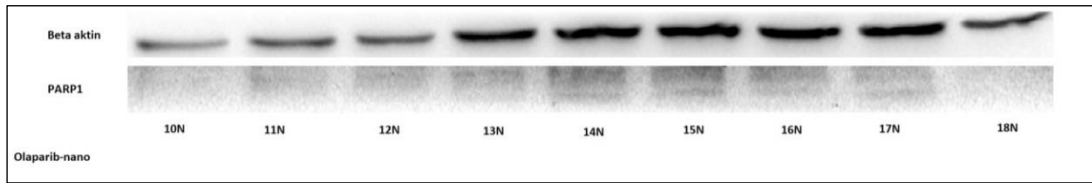
24 kuyucuklu plakalara en az 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, OLA gruplar arasında PARP-2 enzim ekspresyonu seviyeleri karşılaştırılmıştır. İstatistiksel anlamlılığa rastlanmamıştır.

NOLA-PARP1 enzim ekspresyonu sonuçlarına ait bant görüntüleri Resim 4.9 ve Resim 4.10'da gösterildiği gibidir.



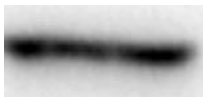
Resim 4.9. NOLA-PARP-1 Bant görüntüsü

1,2:Kontrol; 2,3:Taşıyıcı; 4-6: H₂O₂; 7-9: H₂O₂+ALA



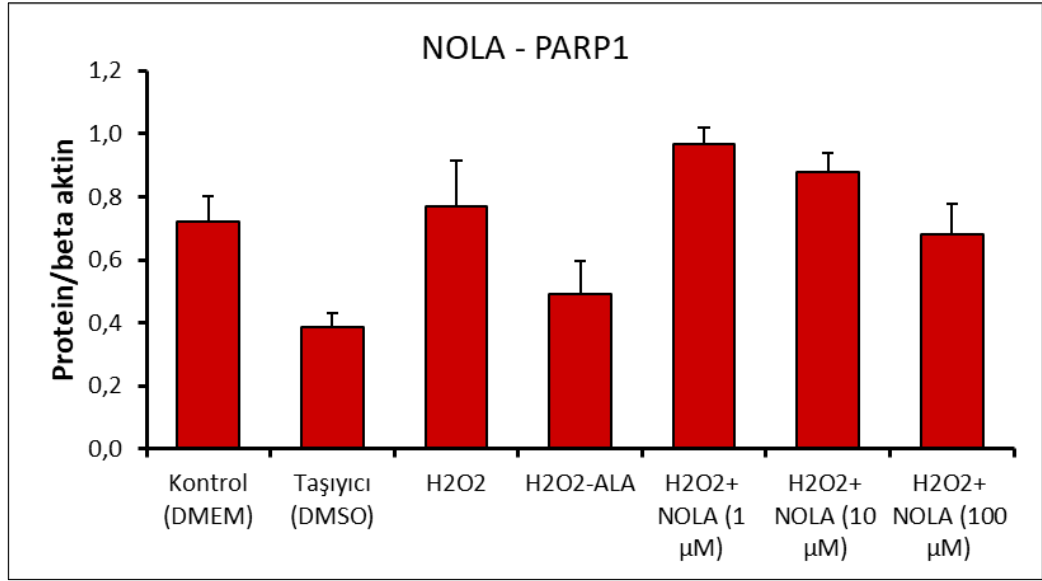
Resim 4.10. NOLA-PARP-1 Bant görüntüsü diğer gruplar

10-12: H₂O₂+OLA (1 µM); 13-15: H₂O₂+OLA (10 µM); 16-18: H₂O₂+OLA (100 µM)

	NOLA-PARP1	β -aktin
Kontrol		
Taşıyıcı		
H₂O₂		
H₂O₂+ALA		
H₂O₂+NOLA (1 μM)		
H₂O₂+NOLA (10 μM)		
H₂O₂+NOLA (100 μM)		

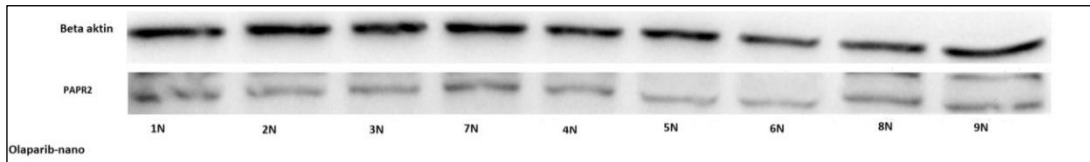
Şekil 4.19. NOLA grubu PARP1 Western Blot analizi örnek bant görüntüleri

Ölçüm yapılan gruplara ait örnek bant görüntüleri Şekil 4.19’da gösterilmektedir. İlgili gruplara ait ölçümler Şekil 4.20’deki grafikte gösterildiği gibidir. Buna göre NOLA gruplarından hiçbirinde PARP-1 enzimi açısından anlamlı fark bulunmamıştır.

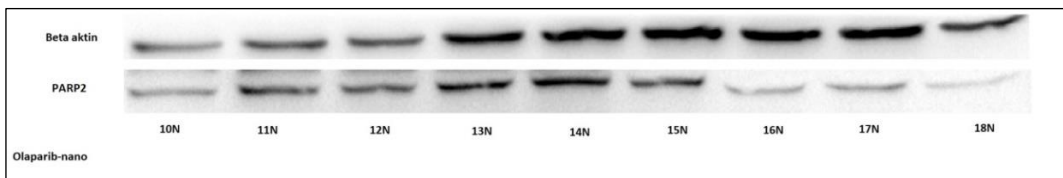


Şekil 4.20. NOLA gruplarında PARP-1 Western Blot sonuçları
24 kuyucuklu plakalara en az 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, NOLA gruplar arasında PARP-1 enzim ekspresyonu seviyeleri karşılaştırılmıştır. İstatistiksel anlamlılığa rastlanmamıştır.

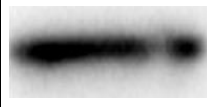
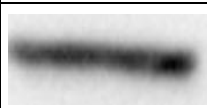
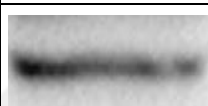
NOLA-PARP2 enzim ekspresyonu sonuçlarına ait bant görüntüleri Resim 4.11 ve Resim 4.12’de gösterildiği gibi olup, ölçüm yapılan gruplar Şekil 4.21’de gösterilmektedir. Buna göre NOLA gruplarından sadece 100 µM NOLA grubunda PARP-2 enzimi açısından anlamlı derecede düşük seviyeye rastlanmıştır (Şekil 4.22).



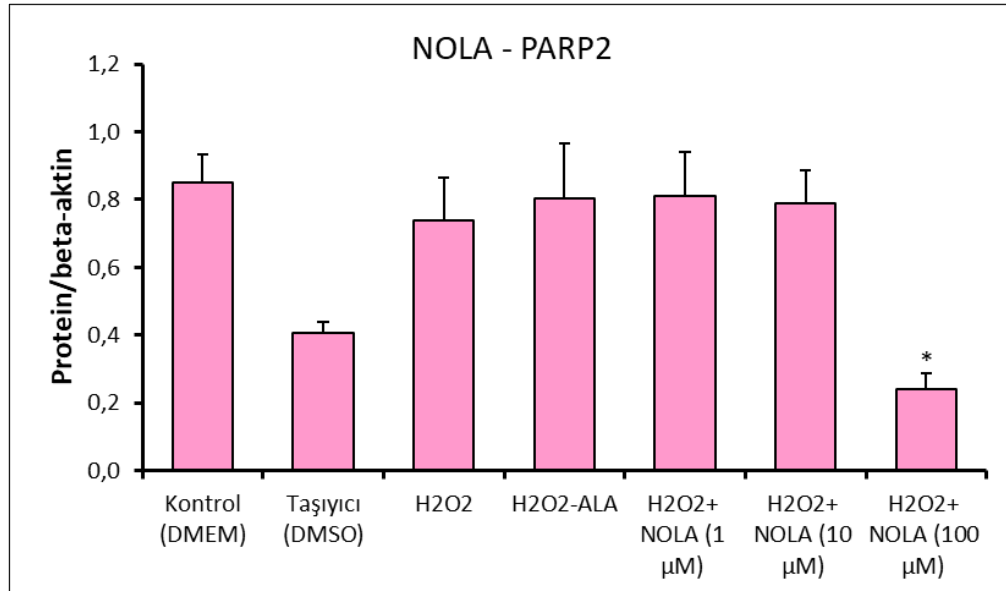
Resim 4.11. NOLA-PARP-2 Bant görüntüsü
1,2:Kontrol; 2,3:Taşıyıcı; 4-6: H₂O₂; 7-9: H₂O₂+ALA



Resim 4.12. NOLA-PARP-2 Bant Görüntüsü diğer gruplar
10-12: H₂O₂+OLA (1 µM); 13-15: H₂O₂+OLA (10 µM); 16-18: H₂O₂+OLA (100 µM)

	NOLA-PARP2	β -aktin
Kontrol		
Taşıyıcı		
H₂O₂		
H₂O₂+ALA		
H₂O₂+NOLA (1 μM)		
H₂O₂+NOLA (10 μM)		
H₂O₂+NOLA (100 μM)		

Şekil 4.21. NOLA grubu PARP-2 Western Blot analizi örnek bant görüntüleri



Şekil 4.22. NOLA gruplarında PARP-2 Western Blot sonuçları

24 kuyucuklu plakalara en az 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılan hücrelerde pozitif, negatif kontrol, Nanoolaparib (NOLA) grupları arasında PARP-2 enzim ekspresyonu seviyeleri karşılaştırılmıştır. Veriler $\pm$ SD olarak verilmiştir * $p < 0.05$ H₂O₂ ile H₂O₂+NOLA 100 μ M karşılaştırıldığında

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında FDA tarafından antikanser ajan olarak onay alan Olaparib'in, olası nöroprotektif, antioksidan ve sitoprotektif etkilerini araştırmak ve uygulanan dozlardaki sitotoksitesine ışık tutmak amaçlanmıştır. Bu bağlamda SH-SY5Y nöroblastoma hattına uygun konsantrasyonda H₂O₂ maruziyetiyle ROS kaynaklı hasar oluşturulması sağlanarak, Olaparib'in pozitif kontrolü olarak seçilen antioksidan ajan alfa lipoik aside karşı etkileri konsantrasyon bağımlı şekilde incelenmiştir.

Çalışmamız Olaparib'in SH-SY5Y nöroblastoma hattında antioksidan birçok parametreyi değerlendirmeye elverişli olması bakımından özgündür. Sitotoksitesi MTT ve MTS yöntemleri ile ayrı ayrı incelenerek elde edilen verilerin doğruluğunun üzerinden geçilmiş ve ayrıca yöntem kıyaslaması da yapılmıştır.

Oluşturulan hasarın ROS ile indüklenmesi SSS'deki endojen ve ekzojen kaynaklı dejenerasyonlara daha geniş ışık tutması maksadıyla seçilmiştir.

Olaparib'in BCS Class 4 olması sebebiyle KBB'den geçişin, geleneksel verilişte istenilen konsantrasyonlara erişiminde sıkıntı doğuracağı fikriyle nanoformülasyon geliştirilmesi yöntemine de gidilmiş olup uygun maliyet ve hızlı uygulanabilirlik açısından nanosüspansiyon şeklinde uygulama tercih edilmiştir.

Bahsi geçen tüm bu uygulamalar çalışmamızı özgün kılmaktadır.

Çalışmanın başında uygulaması yapılan H₂O₂'nin 10 µM'dan itibaren her konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı derecede nöroblastoma hattında canlılığı azalttığı (p<0.01) Şekil 4.2'de görülmektedir. Geri çevrilebilir bir hasar oluşturmak maksadıyla, ilgili literatürlerde de yapılan incelemelerden yola çıkarak %70 canlılık oranı sağlayan 30 µM tercih edilmiştir (145).

SH-SY5Y nöroblastoma hatlarının faz kontrast mikroskopundaki morfolojik görüntüsü OLA grubu için Resim 4.1 'de NOLA grubu için Resim 4.2'de gösterilmiştir. Buna göre OLA ve NOLA grupları hücre konfluensi, proliferasyonu ve morfolojisi bakımından birbirine benzer ve uygun özelliklere sahiptir. Doz uygulaması öncesi uygun morfolojik

özelliklere sahip olup, 30 μM H_2O_2 hasar grubunda proliferasyonda görece azalma, hücreler arası mesafede artma özellikleri göstermiştir. ALA grubunda, 30 μM H_2O_2 hasar grubuna göre proliferasyonda artış olduğu ve kontrol grubuna yakın morfolojik özellikler taşıdığı gözlemlenmiştir. Ancak bahsi geçen veriler kantitatif olarak çalışmamızda ölçülmemiştir.

SEM analizi ile nanosüspansiyonun karakterizasyon ölçümü yapılmış ve partikül boyutu incelenmiştir. Etkin madde taşımayan boş nanosüspansiyon taşıyıcısı için Resim 4.3; Olaparib yüklü nanosüspansiyon için ise Resim 4.4'te görüntüler sunulmaktadır. Bu verilere baktığımızda, 200 nm ölçekte yapılan görüntülemelerde birim mesafeye düşen partikül boyutunun nano seviyeye uygun olduğu desteklenmiştir.

Hazırlanan nanosüspansiyonun partikül boyut ve dağılımına ait veriler Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de sunulmuştur. Bu verilere göre hazırlanan nanosüspansiyonun partikül boyutu nano ölçek seviyesine dağılımı da homojeniteye uygun olarak hazırlanmıştır.

MTT ve MTS yöntemlerinin her ikisi ile birlikte incelenen doz bağımlı sitotoksiste çalışmasında Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te görüldüğü gibi sonuçlar birbiriyle uyumludur. Anlamlı bulunan gruplar da benzerlik göstermektedir. MTS ile yapılan çalışmada Şekil 4.4'te gösterildiği gibi 1 ve 3 μM geleneksel Olaparib uygulamasının $p < 0.05$ düzeyinde bir anlamlılıkla daha az sitotoksik yanıt oluşturduğu veya başka bir deyişle daha yüksek canlılık sağladığı bulunmuştur. Bu yönüyle bakıldığında MTS yönteminin MTT'ye göre daha hassas olduğu düşünülebilir. Bu fark MTS'de yıkama adımının bulunmamasından kaynaklanmış da olabilir (141-143). Bunun haricinde MTS'nin plaka yıkama ve hücre toplama adımları içermemesi, DMSO ilave edilip kristalin çözünmesinin beklenmemesi ve buradaki adımdan doğacak hata payının olmaması gibi durumlar uygulama kolaylığı sunması açısından avantaj olarak düşünülebilir. Ölçüm sonrası plaka üzerindeki supernatantın uzaklaştırılıp TBS tamponu ile yıkama yapıldığı takdirde tabana tutunan hücrelerle çalışmaya devam edilebilmesi de ayrıca avantaj sağlamaktadır.

Hücre zarının bütünlüğü ve zarda meydana gelen hasar açısından fikir sunan LDH enzimi çalışmamızda incelenen parametrelerdendir. Buna göre 100 μM OLA ile negatif kontrol arasında ($p < 0.05$) anlamlı farklılık bulunmaktadır. 100 μM NOLA ile negatif kontrol grupları arasında daha yüksek ($p < 0.01$) anlamlı fark olduğu görülmektedir

(Şekil 4.5). Tedavi grubu olarak tasarlanan 100 μM ALA+ 30 μM H_2O_2 ile negatif kontrol grubu 30 μM H_2O_2 arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p<0.001$) fark olup, tedavi grubu yüksek canlılık oranına sahiptir. Bu verilerden ALA ile oluşturulan tedavi grubunun Olaparib'ten çok daha yüksek seviyede zar bütünlüğü sağladığı sonucunu desteklemektedir. 100 μM NOLA ve OLA ile bu seviyeden daha düşük olmakla birlikte yine hasara karşı bir koruma ve/veya antioksidan etki sağlandığı, ancak ALA kadar bir yanıt sağlanamadığı sonucu çıkmaktadır. Bu veri setine göre 100 μM nanosüspansiyonun aynı konsantrasyonda geleneksel verilise göre antioksidan etki ve/veya hasara karşı koruma açısından daha etkili olduğu görülmektedir.

NO ölçümü sonuçlarına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunan tek grubun 10 μM NOLA ile 30 μM H_2O_2 grupları arasında olduğu görülmektedir. Bu farkın 30 ve 100 μM NOLA'da olmaması bulunan anlamlılığın rastlantısal olabileceği fikrini güçlendirmektedir. Geleneksel ve nanosüspansiyon şeklinde verilisin anlamlı bir fark oluşturmadığı da yine Şekil 4.6'da gösterilmektedir.

Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, Şekil 4.7'de gösterildiği üzere 100 μM OLA ve NOLA grubunda anlamlı derecede düşük seviyelerdedir ($p<0.001$). Bu anlamlılık hasara karşı 100 μM ALA ile tedavi grubu olarak düşünülen grupla aynı seviyededir. Bu açıdan bakıldığında hem geleneksel hem de nanosüspande şekilde verilen Olaparib'in 100 μM dozda 100 μM ALA kadar anlamlı ölçüde lipit peroksidasyonunu azalttığı görülmektedir.

ROS'ların organizmadaki bir diğer hedef noktası protein yapılarındaki sülfür içeren aminoasitlerdir. Bu aminoasitler tiyol grupları (-SH) içermektedir. Tiyol grupları ROS'lar vasıtasıyla oksitlendiğinde disülfid (S-S) yapılarına dönüşür. Bu dönüşüm reversibl olup, aynı zamanda dinamik bir reaksiyondur (146). Bu dinamik denge tiyol/disülfid homeostazını oluşturur. Çalışmamızda antioksidan kapasitenin ölçümü ve değerlendirilmesi açısından bu ölçümlere de yer verilmiştir. Doğal tiyol seviyelerine ait ölçümlere baktığımızda grup içi ve gruplar arası anlamlılık bulunamamıştır (Şekil 4.9). Total tiyol miktar tayininde 3 μM NOLA grubu aynı dozda OLA ile kıyaslandığında anlamlı seviyede düşük bulunmuştur. Benzer anlamlılık NOLA taşıyıcı grubu ile OLA taşıyıcı grup arasında da görülmektedir (Şekil 4.8). Disülfid ile doğal tiyol grupları arasındaki oranın, NOLA gruplarının 100 nM, 3 μM ve taşıyıcı gruplarında OLA'ya

kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Disülfid-total tiyol grupları arasındaki orana ait veriler ile, doğal tiyol- total tiyol grupları arasındaki orana ait verilere baktığımızda her ikisinde de NOLA gruplarının 3 µM ve taşıyıcı gruplarında OLA’ya kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de gösterilmiştir. Disülfid seviyeleri incelendiğinde ise 100 nm NOLA ve 3 µM NOLA grubunun aynı doz OLA grubuna kıyasla anlamlı seviyede düşük ölçümlere sahip olduğu Şekil 4.10’da görölmektedir.

RNS, protein yapılı moleküllerin yapısında bulunan tirozin ile reaksiyonu sonucu meydana gelen bir ürün olan 3-NT seviyesi çalışmamızda incelenen bir diğer parametredir. Şekil 4.14.’te gösterildiği üzere 100 µM OLA ve NOLA gruplarının her ikisi negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük 3-NT seviyelerine sahiptir ($p<0.001$). Aynı anlamlı farklılık tedavi grubunda da bulunmaktadır. Yalnız bu sonuçtan yola çıkarak Olaparibin hem geleneksel hem de nanosüspansiyon şeklinin 3-NT seviyesini düşürmesi açısından olumlu etkiler sergilemiş olabileceği düşünülmektedir.

PARP-1 ve PARP-2 enzim ekspresyonu incelemesi için yaptığımız Western Blot deneyinin sonuçlarına baktığımızda geleneksel verilişle uygulanan 100 µM OLA’nın PARP-1 enzim ekspresyonunda anlamlı bir azalış sağladığı ($p<0.05$), ancak diğer dozlarda PARP-1 enzim ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı bulunmuştur (Şekil 4.16).

Geleneksel verilişle uygulanan Olaparib dozlarının PARP-2 enzim ekspresyonu seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.18).

Nanosüspansiyonla Olaparib uygulamasının PARP-1 enzim ekspresyonu seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.20)

Nanosüspansiyonla Olaparib uygulanan gruplar arasında PARP-2 enzim ekspresyonu seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunan tek dozun 100 µM NOLA grubu ile negatif kontrol arasında olduğu Şekil 4.22’de görölmektedir ($p<0.05$).

Elde ettiğimiz sonuçlara baktığımızda bazı parametreler açısından yüksek doz Olaparib uygulamasının alfa lipoik asite benzer derecede antioksidan ve sitoprotektif etkiler sergileyebileceğine ait bulgulara ulaşılmıştır. Ancak bu etkiler incelediğimiz tüm parametrelerce desteklenmemiştir. Bu açıdan PARP inhibitörleri ile yapılacak daha fazla bilimsel çalışma verisine ihtiyaç vardır.

Hasar dozu oluşturmada yapılan ön çalışma, H_2O_2 'ye maruz bırakmanın, SH-SY5Y nöroblastoma hattında konsantrasyona bağlı hücre canlılığında azalma ile sonuçlandığını göstermektedir.

MTT ve MTS ile yapılan ikili sitotoksiste testlerinde de uyumluluk görülmektedir. MTT'de elde edilen verilerin MTS'de de benzer şekilde olması, yöntem kıyaslaması açısından ikisinin de güvenilir olduğu fikrini desteklemektedir.

Çalışma sonuçları özellikle nanofarmasötiklerin Olaparib gibi yağda ve suda çözünürlüğü düşük olma potansiyeli taşıyan etkin maddeler için hücresel emilim ve hedefleme açısından umut verici olabileceğini göstermektedir.

Nörodejenerasyon ve nörodejeneratif hastalıklar artan yaşam süresiyle sıkça karşımıza çıkan olgulardandır. Konular hakkında ilgili pek çok çalışma yapılsa da patogeneze dair mekanizmaların tamamı halen net olarak aydınlatılamamıştır. Hidrojen peroksit (H_2O_2) veya hidroksil radikali gibi ROS'un neden olduğu oksidatif stres, NO veya peroksinitritin (ONOO-) neden olduğu nitrozatif stres, inflamasyonu, iskemi (veya iskemik reperfüzyon), hipoksi, hipoglisemi ve N- metil- N' -nitro- N gibi DNA-alkile edici ajanlar-nitrosoguanidin (MNNG), genetik faktörler bu patolojileri tetiklediği bilinen etkenlerdir (24, 39). Tetikleyici etkenlerden uzak durmak, ilk yaklaşım olarak düşünülebilir. Farmakolojik olarak da hatalı protein üretiminin önüne geçici ajanlar diğer bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. Ölüm ve sinyal ileti yollarının aydınlatılmasıyla, hatalı protein üretimi ve ağır kusurlu hücrelerin ölüm yoluna girmesini sağlama fikri de ileride mevcut farmakolojik tedavi yaklaşımları olarak karşımıza çıkabilir. Çalışmamızla, direkt olarak sinyal ileti yolağı üzerine olmasa da parthanatos ölüm yolu ve PARP-1 ve PARP-2 enzimlerinin nöronal hasarlar üzerindeki olası etkileri araştırılmıştır. Nöronal hücre ölümü anlayışımızda birçok gelişme olsa da halen önemli boşluklar vardır. Moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması için yeni

araştırmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılacak destekleyici çalışmalarla PARP enzim inhibitörleri ve/veya aktivatörleri de ileride SSS hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar için farmakolojik tedavi yaklaşımları olarak karşımıza çıkabilir.



6. KAYNAKLAR

1. Sidoryk-Wegrzynowicz M, Strużyńska L. Dysfunctional glia: contributors to neurodegenerative disorders. *Neural Regen Res.* 2021;16(2):218-222.
2. Chu T, Shields LBE, Zeng W, Zhang YP, Wang Y, Barnes GN, Shields CB, Cai J. Dynamic glial response and crosstalk in demyelination-remyelination and neurodegeneration processes. *Neural Regen Res.* 2021;16(7):1359-1368.
3. Dorszewska J, Kowalska M, Prendecki M, Piekut T, Kozłowska J, Kozubski W. Oxidative stress factors in Parkinson's disease. *Neural Regen Res.* 2021;16(7):1383-1391.
4. Xiang C, Wang Y, Zhang H, Han F. The role of endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disease. *Apoptosis.* 2017;22(1):1-26.
5. Rana T, Behl T, Mehta V, Uddin MS, Bungau S. Molecular insights into the therapeutic promise of targeting HMGB1 in depression. *Pharmacol Rep.* 2021;73(1):31-42.
6. Sainani SR, Pansare PA, Rode K, Bhalchim V, Doke R, Desai S. Emendation of autophagic dysfunction in neurological disorders: a potential therapeutic target. *Int J Neurosci.* 2022;132(5):466-482.
7. Novellino F, Saccà V, Donato A, Zaffino P, Spadea MF, Vismara M, Arcidiacono B, Malara N, Presta I, Donato G. Innate Immunity: A Common Denominator between Neurodegenerative and Neuropsychiatric Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020; 7;21(3):1115.
8. Kasatkina LA, Heinemann A, Hudz YA, Thomas D, Sturm EM. Stearoyl ethanolamide interferes with retrograde endocannabinoid signalling and supports the blood-brain barrier integrity under acute systemic inflammation. *Biochem Pharmacol.* 2020;174:113783.
9. Galts CPC, Bettio LEB, Jewett DC, Yang CC, Brocardo PS, Rodrigues ALS, Thacker JS, Gil-Mohapel J. Depression in neurodegenerative diseases: Common mechanisms and current treatment options. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019;102:56-84.
10. Bhatt S, Nagappa AN, Patil CR. Role of oxidative stress in depression. *Drug Discov Today.* 2020;25(7):1270-1276.
11. Cosi C, Marien M. Implication of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in

- neurodegeneration and brain energy metabolism. Decreases in mouse brain NAD⁺ and ATP caused by MPTP are prevented by the PARP inhibitor benzamide. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;890:227-239.
12. Curtin NJ, Szabo C. Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond. *Mol Aspects Med.* 2013;34(6):1217-1256.
 13. Guo J, Huang X, Dou L, Yan M, Shen T, Tang W, Li J. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;16;7(1):391.
 14. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science.* 2016;353(6301):777-783.
 15. Demiryürek AT, Demiryürek Ş. Periferik Sinir Hasarı ve Dejenerasyonu, *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2002;27, 43-53.
 16. Mao K, Zhang G. The role of PARP1 in neurodegenerative diseases and aging. *The FEBS Journal.* 2022;289(8):2013-2024.
 17. Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 2019;15(10):565-581.
 18. Bickford PC, Flowers A, Grimmig B. Aging leads to altered microglial function that reduces brain resiliency increasing vulnerability to neurodegenerative diseases. *Exp Gerontol.* 2017;94:4-8.
 19. Mattson MP, Arumugam TV. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metab.* 2018;27(6):1176-1199.
 20. Andreone BJ, Larhammar M, Lewcock JW. Cell Death and Neurodegeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020;12(2):a036434.
 21. Wang ZX, Li YL, Pu JL, Zhang BR. DNA Damage-Mediated Neurotoxicity in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 28;24(7):6313.
 22. Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(7):592-607.
 23. Chen Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.* 2014;30(2):271-281.
 24. Ozcan O, Yönden Z, Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *J. Clin. Exp. Invest.* 2015; 6(3):331-336.

25. Ren JX, Li C, Yan XL, Qu Y, Yang Y, Guo ZN. Crosstalk between Oxidative Stress and Ferroptosis/Oxytosis in Ischemic Stroke: Possible Targets and Molecular Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:6643382.
26. Ebert T, Tran N, Schurgers L, Stenvinkel P, Shiels PG. Ageing - Oxidative stress, PTMs and disease. *Mol Aspects Med*. 2022;86:101099.
27. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ*. 2015;22(3):377-388.
28. Scovassi AI, Poirier GG. Poly(ADP-ribosylation) and apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 1999;199(1-2):125-137.
29. Skoumalová A, Hort J. Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*. 2012;16(10):2291-2300.
30. Söderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G. Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids*. 1991;26(6):421-425.
31. Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology*. 1995;45(8):1594-1601.
32. Butterfield DA, Reed T, Perluigi M, De Marco C, Coccia R, Cini C, Sultana R. Elevated protein-bound levels of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, in brain from persons with mild cognitive impairment. *Neurosci Lett*. 2006;24;397(3):170-3.
33. Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, Ding Q, Chen Q, Butterfield DA, Markesbery WR. Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology*. 2005;12;64(7):1152-6.
34. Praticò D, Clark CM, Lee VM, Trojanowski JQ, Rokach J, FitzGerald GA. Increased 8,12-iso-iPF2 α -VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Ann Neurol*. 2000;48(5):809-812.
35. Basello DA, Scovassi AI. Poly(ADP-ribosylation) and neurodegenerative disorders. *Mitochondrion*. 2015;24:56-63.
36. Ahmed N, Ahmed U, Thornalley PJ, Hager K, Fleischer G, Münch G. Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. *J Neurochem*. 2005;92(2):255-263.

37. Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1994;36(5):747-751.
38. Alkadi H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Infect Disord Drug Targets.* 2020;20(1):16-26.
39. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:715-748.
40. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J Vis Exp.* 2016;(108):53193.
41. Kovalevich J, Santerre M, Langford D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods Mol Biol.* 2021;2311:9-23.
42. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J Vis Exp.* 2016;(108):53193.
43. Wang L, Yang C, Xie C, Jiang J, Gao M, Fu L, Li Y, Bao X, Fu H, Lou L. Pharmacologic characterization of fluzoparib, a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor undergoing clinical trials. *Cancer Sci.* 2019;110(3):1064-1075.
44. Dasovich M, Leung AKL. PARPs and ADP-ribosylation: Deciphering the complexity with molecular tools. *Mol Cell.* 2023;83(10):1552-1572.
45. Harrision D, Gravells P, Thompson R, Bryant HE. Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase (PARG) vs. Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) - Function in Genome Maintenance and Relevance of Inhibitors for Anti-cancer Therapy. *Front Mol Biosci.* 2020;7:191.
46. Soldatenkov VA, Smulson M. Poly(ADP-ribose) polymerase in DNA damage-response pathway: implications for radiation oncology. *Int J Cancer.* 2000;90(2):59-67.
47. Sugimura, T., Miwa, M. Poly(ADP-ribose): Historical perspective. *Mol Cell Biochem* 1994; 138, 5–12.
48. McGurk L, Rifai OM, Bonini NM. Poly(ADP-Ribosylation) in Age-Related Neurological Disease. *Trends Genet.* 2019;35(8):601-613.
49. Jagtap P, Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(5):421-440.
50. Magni G, Amici A, Emanuelli M, Orsomando G, Raffaelli N, Ruggieri S. Enzymology of NAD⁺ homeostasis in man. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(1):19-34.

51. Rongvaux A, Andris F, Van Gool F, Leo O. Reconstructing eukaryotic NAD metabolism. *Bioessays*. 2003;25(7):683-690.
52. Ziegler M. New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur J Biochem*. 2000;267(6):1550-1564.
53. Berger NA, Besson VC, Boulares AH, Bürkle A, Chiarugi A, Clark RS, Curtin NJ, Cuzzocrea S, Dawson TM, Dawson VL, Haskó G, Liaudet L, Moroni F, Pacher P, Radermacher P, Salzman AL, Snyder SH, Soriano FG, Strosznajder RP, Sümegi B, Swanson RA, Szabo C. Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases. *Br J Pharmacol*. 2018;175(2):192-222.
54. Fatokun AA, Dawson VL, Dawson TM. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol*. 2014;171(8):2000-2016.
55. Meyer-Ficca ML, Scherthan H, Bürkle A, Meyer RG. Poly(ADP-ribosyl)ation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis. *Chromosoma*. 2005;114(1):67-74.
56. Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C, Pérez JM. Poly(ADP-ribose) polymerases: homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications. *Prog Biophys Mol Biol*. 2005;88(1):143-172.
57. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(7):517-528.
58. Ménissier de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, Niedergang C, Huber A, Dantzer F, Schreiber V, Amé JC, Dierich A, LeMeur M, Sabatier L, Chambon P, de Murcia G. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J*. 2003;1;22(9):2255-63.
59. Dantzer F, Schreiber V, Niedergang C, Trucco C, Flatter E, De La Rubia G, Oliver J, Rolli V, Ménissier-de Murcia J, de Murcia G. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair. *Biochimie*. 1999;81(1-2):69-75.
60. Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:233-241.
61. Wang ZX, Li YL, Pu JL, Zhang BR. DNA Damage-Mediated Neurotoxicity in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2023;24(7):6313.
62. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res*. 2019;29(5):347-364.

63. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(7):517-528.
64. Cosi C, Marien M. Implication of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in neurodegeneration and brain energy metabolism. Decreases in mouse brain NAD⁺ and ATP caused by MPTP are prevented by the PARP inhibitor benzamide. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;890:227-239.
65. Szabo C, Martins V, Liaudet L. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition in Acute Lung Injury. A Reemerging Concept. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2020;63(5):571-590.
66. Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 28;103(48):18314-9.
67. Zhou Y, Liu L, Tao S, Yao Y, Wang Y, Wei Q, Shao A, Deng Y. Parthanatos and its associated components: Promising therapeutic targets for cancer. *Pharmacol Res.* 2021;163:105299.
68. D'Amours D, Sallmann FR, Dixit VM, Poirier GG. Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 20):3771-3778.
69. Rodríguez-Vargas JM, Oliver-Pozo FJ, Dantzer F. PARP1 and Poly(ADP-ribosyl)ation Signaling during Autophagy in Response to Nutrient Deprivation. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:2641712.
70. McGurk L, Rifai OM, Bonini NM. Poly(ADP-Ribosylation) in Age-Related Neurological Disease. *Trends Genet.* 2019;35(8):601-613.
71. Diefenbach J, Bürkle A. Poly-ADP-ribosylation in health and disease: Introduction to poly (ADP-ribose) metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS.* 2005;62:721-30.
72. Beneke S, Diefenbach J, Bürkle A. Poly(ADP-ribosyl)ation inhibitors: promising drug candidates for a wide variety of pathophysiologic conditions. *Int J Cancer.* 2004;111(6):813-818.
73. Lakshmi TV, Bale S, Khurana A, Godugu C. Tankyrase as a Novel Molecular Target in Cancer and Fibrotic Diseases. *Curr Drug Targets.* 2017;18(10):1214-1224.
74. Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol.* 2009;218(2):193-202.

75. Koh DW, Lawler AM, Poitras MF, Sasaki M, Wattler S, Nehls MC, Stöger T, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM. Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 21;101(51):17699-704.
76. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*. 2002;54(3):375-429.
77. Oliver AW, Amé JC, Roe SM, Good V, de Murcia G, Pearl LH. Crystal structure of the catalytic fragment of murine poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(2):456-464.
78. Gros Lambert J, Prokhorova E, Ahel I. ADP-ribosylation of DNA and RNA. *DNA Repair (Amst)*. 2021;105:103144.
79. Wang SSY, Jie YE, Cheng SW, Ling GL, Ming HVY. PARP Inhibitors in Breast and Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023;15(8):2357.
80. Luo X, Kraus WL. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev*. 2012;26(5):417-432.
81. Kaur SD, Chellappan DK, Aljabali AA, Tambuwala M, Dua K, Kapoor DN. Recent advances in cancer therapy using PARP inhibitors. *Med Oncol*. 2022;39(12):241.
82. Hikosaka K, Yaku K, Okabe K, Nakagawa T. Implications of NAD metabolism in pathophysiology and therapeutics for neurodegenerative diseases. *Nutr Neurosci*. 2021;24(5):371-383.
83. Bruin MAC, Sonke GS, Beijnen JH, Huitema ADR. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of PARP Inhibitors in Oncology. *Clin Pharmacokinet*. 2022;61(12):1649-1675.
84. Shah AP, Patel CN, Sureja DK, Sanghavi KP. A Review on DNA Repair Inhibition by PARP Inhibitors in Cancer Therapy. *Folia Med (Plovdiv)*. 2018;60(1):39-47.
85. McGurk L, Rifai OM, Bonini NM. Poly(ADP-Ribosylation) in Age-Related Neurological Disease. *Trends Genet*. 2019;35(8):601-613.
86. Matsuno Y, Hyodo M, Fujimori H, Shimizu A, Yoshioka K-i. Sensitization of cancer cells to radiation and topoisomerase 1 inhibitor camptothecin using inhibitors of PARP and other signaling molecules. *Cancers*. 2018; 10(10):364.
87. Calvert H, Azzariti A. The clinical development of inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Ann Oncol*. 2011;22 Suppl 1:i53-9.
88. Lee A. Fuzuloparib: First Approval. *Drugs*. 2021;81(10):1221-1226.

- 89.** Markham A. Pamiparib: First Approval. *Drugs*. 2021;81(11):1343-1348.
- 90.** Curtin N.J., Szabo C., Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2020;19:711-736.
- 91.** Liu C, Fang Y. New insights of poly(ADP-ribosylation) in neurodegenerative diseases: A focus on protein phase separation and pathologic aggregation. *Biochem Pharmacol*. 2019;167:58-63.
- 92.** Brady PN, Goel A, Johnson MA. Poly(ADP-Ribose) polymerases in host-pathogen interactions, inflammation, and immunity. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2018;83(1):e00038-18.
- 93.** Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, Audeh MW, Friedlander M, Balmaña J, Mitchell G, Fried G, Stemmer SM, Hubert A, Rosengarten O, Steiner M, Loman N, Bowen K, Fielding A, Domchek SM. Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J Clin Oncol*. 2015; 20;33(3):244-50.
- 94.** Vignani F, Tambaro R, De Giorgi U, Giannatempo P, Bimbatti D, Carella C, Stellato M, Atzori F, Aieta M, Masini C, Hamzaj A, Ermacora P, Veccia A, Scandurra G, Gamba T, Ignazzi G, Pignata S, Di Napoli M, Lolli C, Procopio G, Pierantoni F, Zonno A, Santini D, Di Maio M; Meet-URO12 Investigators. Addition of niraparib to best supportive care as maintenance treatment in patients with advanced urothelial carcinoma whose disease did not progress after first-line platinum-based chemotherapy: The Meet-URO12 randomized phase 2 trial. *Eur Urol*. 2023;83(1):82-89.
- 95.** Jain PG, Patel BD. Medicinal chemistry approaches of poly ADP-Ribose polymerase 1 (PARP1) inhibitors as anticancer agents - A recent update. *Eur J Med Chem*. 2019;165:198-215.
- 96.** Hoy SM. Talazoparib: First Global Approval. *Drugs*. 2018;78(18):1939-1946.
- 97.** Berger NA, Besson VC, Boulares AH, Bürkle A, Chiarugi A, Clark RS, Curtin NJ, Cuzzocrea S, Dawson TM, Dawson VL, Haskó G, Liaudet L, Moroni F, Pacher P, Radermacher P, Salzman AL, Snyder SH, Soriano FG, Strosznajder RP, Sümegi B, Swanson RA, Szabo C. Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases. *Br J Pharmacol*. 2018;175(2):192-222.
- 98.** Cortesi L, Rugo HS, Jackisch C. An Overview of PARP Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer. *Target Oncol*. 2021;16(3):255-282.

99. Mateo J, Lord CJ, Serra V, Tutt A, Balmaña J, Castroviejo-Bermejo M, Cruz C, Oaknin A, Kaye SB, de Bono JS. A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective. *Ann Oncol.* 2019;1;30(9):1437-1447.
100. Balmaña J, Tung NM, Isakoff SJ, Graña B, Ryan PD, Saura C, Lowe ES, Frewer P, Winer E, Baselga J, Garber JE. Phase I trial of olaparib in combination with cisplatin for the treatment of patients with advanced breast, ovarian and other solid tumors. *Ann Oncol.* 2014;25(8):1656-63.
101. Fulton B, Short SC, James A, Nowicki S, McBain C, Jefferies S, Kelly C1, Stobo J, Morris A, Williamson A, Chalmers AJ. PARADIGM-2: Two parallel phase I studies of olaparib and radiotherapy or olaparib and radiotherapy plus temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma, with treatment stratified by MGMT status. *Clin Transl Radiat Oncol.* 2017;8:12-16.
102. Lesueur P, Lequesne J, Grellard JM, Dugué A, Coquan E, Brachet PE, Geffrelot J, Kao W, Emery E, Berro DH, Castera L, Goardon N, Lacroix J, Lange M, Capel A, Leconte A, Andre B, Léger A, Lelaidier A, Clarisse B, Stefan D. Phase I/IIa study of concomitant radiotherapy with olaparib and temozolomide in unresectable or partially resectable glioblastoma: OLA-TMZ-RTE-01 trial protocol. *BMC Cancer.* 2019; 4;19(1):198.
103. Santos SS, Brunialti MKC, Soriano FG, Szabo C, Salomão R. Repurposing of Clinically Approved Poly-(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors for the Therapy of Sepsis. *Shock.* 2021; 1;56(6):901-909.
104. Yang B, Gao J, Pei Q, Xu H, Yu H. Engineering Prodrug Nanomedicine for Cancer Immunotherapy. *Adv Sci (Weinh).* 2020;7(23):2002365.
105. Olsen AL, Feany MB. PARP Inhibitors and Parkinson's Disease. *N Engl J Med.* 2019;380(5):492-494.
106. Martire S, Mosca L, d'Erme M. PARP-1 involvement in neurodegeneration: A focus on Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mech Ageing Dev.* 2015;146-148:53-64.
107. Komirishetty P, Areti A, Yerra VG, Ruby PK, Sharma SS, Gogoi R, Sistla R, Kumar A. PARP inhibition attenuates neuroinflammation and oxidative stress in chronic constriction injury induced peripheral neuropathy. *Life Sci.* 2016; 1;150: 50-60.
108. Czapski GA, Cieřlik M, Wencel PL, Wójtowicz S, Strosznajder RP, Strosznajder JB. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 alters expression of mitochondria-related genes in PC12 cells: relevance to mitochondrial homeostasis

- in neurodegenerative disorders. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018;1865(2):281-288.
109. Ordway GA, Szebeni A, Hernandez LJ, Crawford JD, Szebeni K, Chandley MJ, Burgess KC, Miller C, Bakkalbasi E, Brown RW. Antidepressant-like actions of inhibitors of poly(ADP-Ribose) polymerase in rodent models. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2017;1;20(12):994-1004.
 110. Rose M, Burgess JT, O'Byrne K, Richard DJ, Bolderson E. PARP inhibitors: Clinical relevance, mechanisms of action and tumor resistance. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8: 564601.
 111. Pazzaglia S, Pioli C. Multifaceted Role of PARP-1 in DNA Repair and Inflammation: Pathological and Therapeutic Implications in Cancer and Non-Cancer Diseases. *Cells.* 2019;9(1):41.
 112. Wu W, Hill SE, Nathan WJ, Paiano J, Callen E, Wang D, Shinoda K, van Wietmarschen N, Colón-Mercado JM, Zong D, De Pace R, Shih HY, Coon S, Parsadanian M, Pavani R, Hanzlikova H, Park S, Jung SK, McHugh PJ, Canela A, Chen C, Casellas R, Caldecott KW, Ward ME, Nussenzweig A. Neuronal enhancers are hotspots for DNA single-strand break repair. *Nature.* 2021;593(7859):440-444.
 113. Heo YA, Dhillon S. Olaparib Tablet: A Review in Ovarian Cancer Maintenance Therapy. *Target Oncol.* 2018;13(6):801-808.
 114. Christ TN. Olaparib: A tale of two dosage forms. *Semin Oncol.* 2019;46(1):100-101.
 115. McCormick A, Swaisland H. In vitro assessment of the roles of drug transporters in the disposition and drug-drug interaction potential of olaparib. *Xenobiotica.* 2017;47(10):903-915.
 116. Zhang H, Bao Z, Liao H, Li W, Chen Z, Shen H, Ying S. The efficacy and safety of tivantinib in the treatment of solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;3;8(68):113153-113162.
 117. Yonemori K, Tamura K, Kodaira M, Fujikawa K, Sagawa T, Esaki T, Shirakawa T, Hirai F, Yokoi Y, Kawata T, Hatano B, Takahashi Y. Safety and tolerability of the olaparib tablet formulation in Japanese patients with advanced solid tumours. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;78(3):525-31.
 118. Wolff BJ, Wolff MJ, Wolff JE. Headache Reporting in Oncology Trials Depends on the Demographics of the Study Population. *In Vivo.* 2021;35(4):1939-1943.

119. Sun K, Mikule K, Wang Z, Poon G, Vaidyanathan A, Smith G, Zhang ZY, Hanke J, Ramaswamy S, Wang J. A comparative pharmacokinetic study of PARP inhibitors demonstrates favorable properties for niraparib efficacy in preclinical tumor models. *Oncotarget*. 2018; 14;9(98):37080-37096.
120. Zimmer AS, Gillard M, Lipkowitz S, Lee JM. Update on PARP Inhibitors in Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2018;19(5):21.
121. Slade D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. *Genes Dev*. 2020;34(5-6):360-394.
122. Ullal AV, Reiner T, Yang KS, Gorbato R, Min C, Issadore D, Lee H, Weissleder R. Nanoparticle-mediated measurement of target-drug binding in cancer cells. *ACS Nano*. 2011; 22;5(11):9216-24.
123. Gonzales J, Kossatz S, Roberts S, Pirovano G, Brand C, Pérez-Medina C, Donabedian P, de la Cruz MJ, Mulder WJM, Reiner T. Nanoemulsion-based delivery of fluorescent PARP inhibitors in mouse models of small cell lung cancer. *Bioconjug Chem*. 2018; 21;29(11):3776-3782.
124. Novohradsky V, Zajac J, Vrana O, Kasparkova J, Brabec V. Simultaneous delivery of olaparib and carboplatin in PEGylated liposomes imparts this drug combination hypersensitivity and selectivity for breast tumor cells. *Oncotarget*. 2018;9(47):28456-28473.
125. Asefy Z, Hoseinnejhada S, Ceferov Z. Nanoparticles approaches in neurodegenerative diseases diagnosis and treatment. *Neurol Sci*. 2021;42(7):2653-2660.
126. Li Y, Cen Y, Tu M, Xiang Z, Tang S, Lu W, Zhang H, Xu J. Nanoengineered Gallium Ion Incorporated Formulation for Safe and Efficient Reversal of PARP Inhibition and Platinum Resistance in Ovarian Cancer. *Research (Wash D C)*. 2023;6: 0070.
127. Ottria R, Ravelli A, Miceli M, Casati S, Orioli M, Ciuffreda P. Quantitative Characterization of Olaparib in Nanodelivery System and Target Cell Compartments by LC-MS/MS. *Molecules*. 2019;11;24(5):989.
128. Kim D, Nam HJ. PARP Inhibitors: Clinical Limitations and Recent Attempts to Overcome Them. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15):8412.
129. Mattern-Schain SI, Fisher RK, West PC, Grimsley LB, Harris TM, Grandas OH, Best MD, Mountain DJH. Cell mimetic liposomal nanocarriers for tailored delivery

- of vascular therapeutics. *Chem Phys Lipids*. 2019;218:149-157.
130. Iturrioz-Rodríguez N, Bertorelli R, Ciofani G. Lipid-Based Nanocarriers for The Treatment of Glioblastoma. *Adv Nanobiomed Res*. 2020;1(2):2000054.
 131. Ferreira MD, Duarte J, Veiga F, Paiva-Santos AC, Pires PC. Nanosystems for brain targeting of antipsychotic drugs: An update on the most promising nanocarriers for increased bioavailability and therapeutic efficacy. *Pharmaceutics*. 2023; 17;15(2):678.
 132. van de Ven AL, Tangutoori S, Baldwin P, Qiao J, Gharagouzloo C, Seitzer N, Clohessy JG, Makrigiorgos GM, Cormack R, Pandolfi PP, Sridhar S. Nanoformulation of Olaparib Amplifies PARP Inhibition and Sensitizes PTEN/TP53-Deficient Prostate Cancer to Radiation. *Mol Cancer Ther*. 201;7;16(7):1279-1289.
 133. Novohradsky V, Zajac J, Vrana O, Kasparkova J, Brabec V. Simultaneous delivery of olaparib and carboplatin in PEGylated liposomes imparts this drug combination hypersensitivity and selectivity for breast tumor cells. *Oncotarget*. 2018;9(47):28456-28473.
 134. Rabinow BE. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(9):785-796.
 135. Duran T. , Karakuş O. , Değim İ. T. , Eser B. , Sezigen S. , Güney Z. , Uluoğlu C. Evaluating of Two Type of Cyclosporine-A Containing Nanosuspension for Ophthalmic Administration. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences* 2021; 5(3): 107-116.
 136. Junghanns JU, Müller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine*. 2008;3(3):295-309.
 137. Poovaiah N, Davoudi Z, Peng H, Schlichtmann B, Mallapragada S, Narasimhan B, Wang Q. Treatment of neurodegenerative disorders through the blood-brain barrier using nanocarriers. *Nanoscale*. 2018;20;10(36):16962-16983.
 138. Goel S, Sachdeva M, Agarwal V. Nanosuspension Technology: Recent Patents on Drug Delivery and their Characterizations. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2019;13(2):91-104.
 139. https://en.0wikipedia.org/wiki/Biopharmaceutics_Classification_System,Erişim Tarihi:23/07/2023.
 140. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay

for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012;114(8):785-96.

141. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers.* 2020;1:332–349.
142. Erkekoğlu P, Baydar T. Güncel In Vitro Sitotoksikite Testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy.* 2021;41(1):45-63.
143. Creative Bioarray (2022). Comparison of Different Methods to Measure Cell Viability.<https://www.creative-bioarray.com/support/comparison-of-different-methods-to-measure-cell-viability.htm>. Erişim Tarihi: 25/07/2023
144. An X, Fu Z, Mai C, Wang W, Wei L, Li D, Li C, Jiang LH. Increasing the TRPM2 Channel Expression in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Augments the Susceptibility to ROS-Induced Cell Death. *Cells.* 2019; 8;8(1):28.
145. Lopez-Suarez L, Awabdh SA, Coumoul X, Chauvet C. The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants. *Neurotoxicology.* 2022;92:131-155.
146. Erel Ö, Erdoğan S. Thiol-disulfide homeostasis: an integrated approach with biochemical and clinical aspects. *Turk J Med Sci.* 2020 ; 3;50(SI-2):1728-1738.

7. ÖZGEÇMİŞ

İlköğretimi Ankara’da, lise öğrenimimi Gaziantep Anadolu Lisesi’nde, üniversite öğrenimimi de 2015 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nde tamamladım. 2016 yılında Gaziantep Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında doktora öğrenimime başladım. Kamu hastanesinde eczacı olarak çalışmaktayım.

