

KONYA GIDA VE TARIM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**APTAMER ARACILI KONTROLLÜ YAYIMLA
KARBENDAZİM'İN HeLa SERVİKAL KANSER
HÜCRELERİNDEKİ GELİŞTİRİLMİŞ ANTİTÜMÖR
AKTİVİTESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif Esmâ ACAR

KONYA

HAZİRAN, 2020

KONYA GIDA VE TARIM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**APTAMER ARACILI KONTROLLÜ YAYIMLA
KARBENDAZİM'İN HeLa SERVİKAL KANSER
HÜCRELERİNDEKİ GELİŞTİRİLMİŞ ANTİTÜMÖR
AKTİVİTESİ**

Elif Esmâ ACAR

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mahmut Deniz YILMAZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Meram-KONYA

HAZİRAN, 2020

Bu tezi okuduğumu ve tezin Yüksek Lisans derecesi için yeterli, alanına uygun ve istenilen niteliklere sahip olduğuna kanaat getirdiğimi onaylarım.

.....

Doç. Dr. Mahmut Deniz YILMAZ (Danışman)

Bu tezi okuduğumu ve tezin Yüksek Lisans derecesi için yeterli, alanına uygun ve istenilen niteliklere sahip olduğuna kanaat getirdiğimi onaylarım.

.....

Prof. Dr. Veli Cengiz ÖZALP

Bu tezi okuduğumu ve tezin Yüksek Lisans derecesi için yeterli, alanına uygun ve istenilen niteliklere sahip olduğuna kanaat getirdiğimi onaylarım.

.....

Dr. Öğr. Üyesi Yusuf ÇAKMAK

Bu tezi okuduğumu ve tezin Yüksek Lisans derecesi için yeterli, alanına uygun ve istenilen niteliklere sahip olduğuna kanaat getirdiğimi onaylarım.

.....

Prof. Dr. Sencer BUZRUL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Elif Esmâ ACAR tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan ‘‘Aptamer Aracılı Kontrollü Yayınla Karbendazim’in HeLa Servikal Kansere Hücresindeki Geliştirilmiş Antitümör Aktivitesi’’ başlıklı bu çalışma KGTÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile KGTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 22/06/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza:

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Veli Cengiz ÖZALP

Raportör Üye: Doç. Dr. Mahmut Deniz Yılmaz

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Yusuf ÇAKMAK

ÖZET**APTAMER ARACILI KONTROLLÜ YAYIMLA KARBENDAZİM'İN
HeLa SERVİKAL KANSER HÜCRELERİNDEKİ GELİŞTİRİLMİŞ
ANTİTÜMÖR AKTİVİTESİ**

ACAR, Elif Esma

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mahmut Deniz YILMAZ

Haziran 2020, 64 Sayfa

Bazı kanser türlerinde önemli araştırma ve ilaç geliştirme çalışmalarına rağmen, mortalite, prevalans ve nüks oranları hala çok yüksektir. Hedefleme kabiliyetine sahip ilaçların taşınması, ilaç etkinliğini artırarak ve yan etkileri sınırlandırarak kanser tedavisi için umut vaat eden teknolojilerden biridir. Bu çalışmada karbendazimin servikal kanser hücreleri üzerindeki antitümör aktivitesini artırmak için değiştirilebilir aptamerler ve silika nanopartikül ile kontrollü ve hedefli salıma dayanan bir yaklaşım araştırılmıştır. Karbendazim, geniş spektrumlu bir fungusittir ve ayrıca şu anda faz II klinik öncesi çalışmalarda olan üreme ve gelişimsel toksik madde olarak ümit verici deneysel bir antitümör ilacıdır. Çalışmamızda nükleolin (AS1411) bağlayıcı aptamerler, uyarıcı-bağımlı bir salım sistemi elde etmek için MCM-41 tipi silika nanopartiküllerinin nanoporları içindeki karbendazim moleküllerini tutmak için kullanılmıştır. Karbendazim yüklü aptamer silika kompleksinin etkisi test edilmiş ve HeLa hücreleri üzerindeki serbest karbendazim muamelesiyle karşılaştırılarak, dağıtım sistemimizin hedef hücrelerde toksisiteyi 3,3 kat arttığı tespit edilmiştir. Kompleksin sitotoksitesinin, çoğunlukla apoptozisin artmasına ve nekrozla ilişkili yolların daha az uzamasına bağlı olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anti-tümör, Aptamer, Rahim ağzı kanseri, Nanopartikül

ABSTRACT

**ENHANCED ANTITUMOR ACTIVITY OF CARBENDAZIM ON
HeLa CERVICAL CANCER CELLS BY APTAMER MEDIATED
CONTROLLED RELEASE**

ACAR, Elif Esma

MSc in Biotechnology Program

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mahmut Deniz YILMAZ

June 2020, 64 Pages

Despite significant research and drug development studies, mortality, prevalence and recurrence rates are still very high in some cancer types. Transporting drugs with targeting ability is one of the promising technologies for cancer treatment by increasing drug effectiveness and limiting side effects. In this study, a controlled and targeted release-based approach with interchangeable aptamers and silica nanoparticle was investigated to increase the antitumor activity of carbendazim on cervical cancer cells. Carbendazim is a broad spectrum fungicide and is also a promising experimental antitumor drug as a reproductive and developmental toxic substance currently in phase II preclinical studies. In this study, nucleoline (AS1411) binding aptamers were used to capture carbendazim molecules in the nanoporbins of the MCM-41 type silica nanoparticles to achieve a stimulating-dependent release system. The effect of the carbendazim-loaded aptamer silica complex has been tested and showed that our distribution system increased toxicity 3.3-fold compared to the free carbendazim treatment on HeLa cells. It has been determined that the cytotoxicity of the complex is mostly due to increased apoptosis and less prolonged pathways associated with necrosis.

Keywords: Anti-tumor, Aptamer, Cervical Cancer, Nanoparticles

TEŐEKKÜR

Laboratuvarda her zaman destek olup, yol gösterdiği için yüksek lisans tez danışmanım Doç. Dr. Mahmut Deniz YILMAZ'a, deneysel çalışmalarındaki verilerin sağlanmasında kolaylık gösteren ve özellikle kıymetli görüşlerinden yararlandığım Prof. Dr. Veli Cengiz ÖZALP'e, laboratuvarda deneysel çalışmalarım sırasında kıymetli tecrübelerini ve bilgisini esirgemeyen hocam Mert SUDAĞIDAN'a, laboratuvar çalışmalarımda bana tecrübeleriyle yardımcı olan Hatice Kübra KARA ve Onur BULUT'a, gerekli malzeme ve alt yapısını kullandığım KGTÜ, KİT-ARGEM'e (Yeni Nesil Gıda Kit ve Referans Madde Araştırma ve Geliştirme Merkezi), bu süreçte her zaman yanımda olan laboratuvar arkadaşlarım sevgili Behiye Büşra TAŐBAŐI ve Mediha Nur Zafer YURT'a ve son olarak her zaman olduğu gibi bu süreçte de yanımda olan aileme teşekkürü borç bilirim.



YEMİN METNİ

Yüksek Lisans olarak sunduğum "APTAMER ARACILI KONTROLLÜ YAYIMLA KARBENDAZİM'İN HeLa SERVİKAL KANSER HÜCRELERİNDEKİ GELİŐTİRİLMİŐ ANTİTÜMÖR AKTİVİTESİ" adlı çalıŐmanın tarafımdan bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı dűŐecek bir yardıma baŐvurmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin bibliyografyada gösterilenlerden olduğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmıŐ olduğunu belirtir ve bunu onurumla doğrularım.

22/06/2020

Elif Esmā ACAR

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	3
2.1. Servikal Kanser HeLa Hücreleri	3
2.2. Servikal Kanser HeLa Hücreleri Tedavisi	5
2.2.1. Klinikte kullanılan bazı kemoterapötik ajanlar	6
2.3. Servikal Kanser HeLa Hücrelerinde Hedef Bölgeye Nanopartikülün Taşınımı	9
2.3.1. Nanopartiküller	9
2.4. Servikal Kanser HeLa Hücrelerinde Hedef Bölgenin Tanınması	11
2.4.1 Monoklonal antikorlar	12
2.4.2. Aptamerler	13

3.YÖNTEM.....	21
3.1. Aptamer Kapısı	21
3.3. Nükleolin Aptamer kapılı Silika Eşleniklerinin Hücre Kültürü Ortamı	23
3.4. AS1411 Aptamerinin Hela Hücrelerine Bağlanması	23
3.6. WST-1 Hücre Proliferasyon Deneyi	24
3.7. Apoptoz / Nekroz Analizi.....	24
3.8. İstatistiksel Analiz.....	25
4. BULGULAR	26
4.1. Karbendazim Yüklü Silika-Aptamer Nanopartiküllerinin Fonksiyonel Karakterizasyonu	26
4.2. Nükleolin Aptamer Kapılarının ve Silika Konjugatlarının Hedeflenmesi	29
4.3. Karbendazim ve Karb-Apt-Snp'lerin Hela Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkileri	31
4.4. Apoptoz / Nekroz Deneyleri.....	34
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	37
6. KAYNAK DİZİNİ	41

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil

Sayfa

1.1 Çalışmamızda geliştirilen karbendazim taşıma sisteminin çalışma prensibi.....	1
2.1.1 DMEM kültür ortamında büyütülen HeLa hücrelerinin 10x oranında mikroskop görüntüsü	2
2.2.1.1 Taksol ve doksorubisinin kimyasal yapısı.....	4
2.2.1.1.1 Benomil ve karbendazimin kimyasal yapısı.....	5
2.4.2.4.1 Mezo-gözenekli silika ve ATP aptamer sekansları ile hazırlanmış geriye kapanmayan (üstte) ve açılıp-kapanan (altta) moleküler kapı örnekleri.....	18
4.1.1 Sentezlenen silika nanopartiküllerin karakterizasyonu.....	10
4.1.2 Karb-Apt-SNP partiküllerinden fosfat tamponu içerisinde (kırmızı çizgi) veya nükleolin proteini varlığında (siyah çizgi) karbendazim salım kinetiği.....	11
4.1.3 Nükleolin aptamer kapı yapısının 10, 100 ve 500 nM nükleolin proteini eklenerek FRET analizi ile açılma özelliğinin incelenmesi.....	12
4.2.2 Floresan işaretli nükleolin aptamer kapı yapısının HeLa hücrelerini hedefleme özelliklerinin akış sitometrisi ile çalışılması.....	13
4.3.1 HeLa hücrelerinin değişik karbendazim (Karb), Apt-SNP veya Karb-Apt-SNP ile inkübe edildikten sonra CCK-8 metodu ile belirlenmiş canlılık oranları.....	14
4.3.2 CCK-8 tayin metodu ile 60 µM karbendazim için zamana karşı hücre canlılık analizi.....	15

4.4.1 Karbendazimin HeLa hücrelerini inhibisyon mekanizması.....	16
4.4.2 Canlı, apoptoz yapan ve nekroz olan hücrelerin oranlarının zamana göre analizi.....	35



SİMGELER VE KISALTMALAR**Simgeler****Açıklama**

°C	Santigrat derece
CO ₂	Karbondioksit
g	Gram
HCl	Hidrojen Klorür
kDa	Kilo dalton
Kg	Kilogram
µl	Mikrolitre
m	Metre
M	Molar
µM	Mikromolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Minimolar
mV	Milivolt
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
nmol	Nanomol

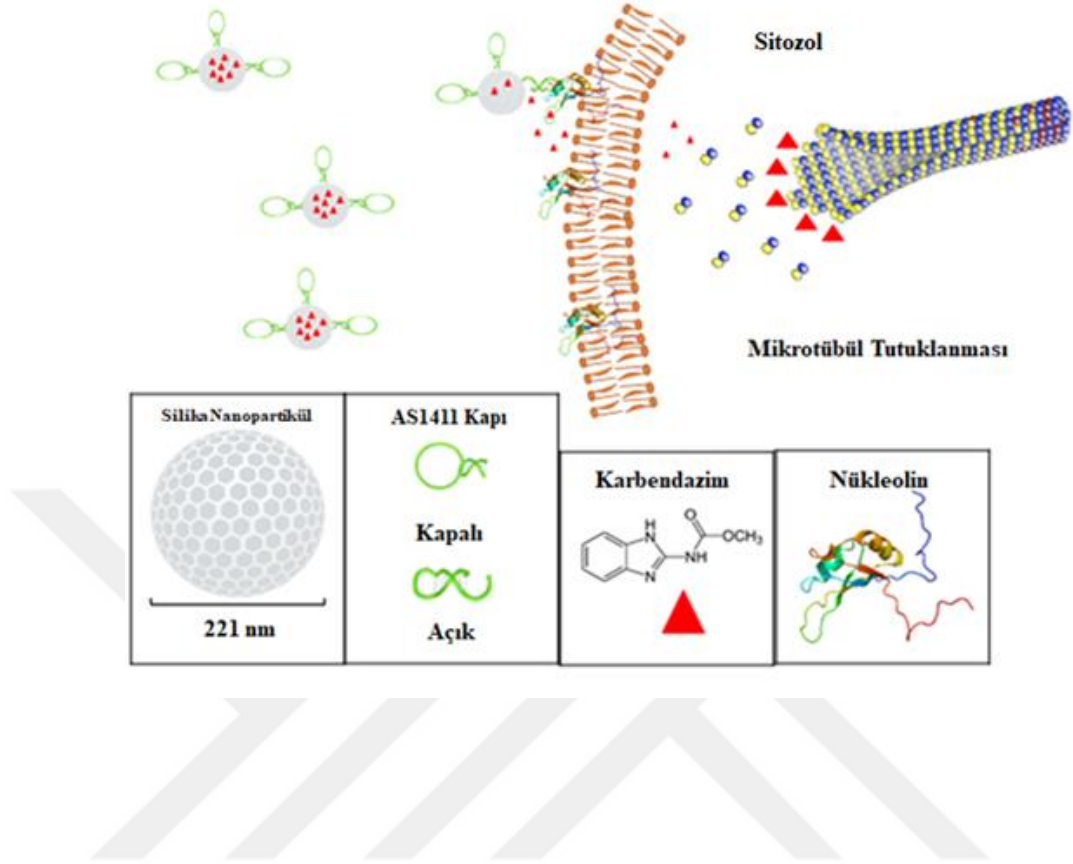
Kısaltmalar**Açıklama**

ANOVA	Analysis of Variance
BET	Brunnauer, Emmett ve Teller
BSA	Bovine Serum Albumin
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CTAB	N-cetyltrimethylammonium bromide
DLS	Dinamik Işıık Saçılımı
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FAM	Fluorescein amidite
FBS	Fetal bovine serum
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
HPV	İnsan papilloma virüsü
IC ₅₀	%50 oranında inhibitör konsantrasyonu
Ig	İmmünoglobulin
IUAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Karb	Karbendazim
mAb	Monoklonal antikor
MCM-41	Mobil Composition of Matter No. 41
MSN	Mezoporöz silika nanopartikül

MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)
NP	Nanopartikül
nt	Nükleotit
PI	Propidium iodide
RFU	Relative Fluorescence Units
SELEX	Üstsel zenginleştirme ile ligantların sistematik evrimi
SNP	Silika Nanopartikül
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TEOS	Tetraetoksilan
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Bu çalışmada anti-kanser özellikleri bilinen karbendazim molekülleri, silika nanopartikülleri yüzeyindeki mezoporlar içerisine aptamer kapılar ile hapsedilerek etkilerinin arttığı gösterilmiştir. Şekil 1.1de özetlendiği gibi ilk aşamada 221 nm çapındaki düzenli mezoporlarla kaplı mezoporlu silika nanopartikülleri karbendazim molekülleri ile doldurulmuş ve AS1411 aptamer kapılarıyla mezopor ağızları kovalent bağlanma ile kapatılmıştır. Bu şekilde nanopartiküller içerisine hapsedilen karbendazim aptamerlerin spesifik olarak tümör hücre yüzeylerinde bulunan nükleolin proteinlerine yönlendirmesiyle ilaç etkisinin artırıldığı gösterilmiştir. Hücre zarında aptamer kapı molekülleri nükleolin proteini ile bağlandığı zaman konformasyonel değişikliğe gideceğinden ve mezopor ağızları boş kalacağından içeride hapsolmuş karbendazim molekülleri serbest kalarak por dışına çıkmaktadır. Bu şekilde hücre yüzeyinde karbendazim miktarı zamanla artmaktadır. Böylece karbendazim hücre içerisine sızmakta ve mikrotübül entegrasyon/bozulma son bölgeleriyle etkileşime geçerek mikrotübül tutuklanması olarak ifade edilen hücre içi soruna neden olarak hücrenin ölmesine giden bir süreç başlatmaktadır.



Şekil 1.1: Çalışmamızda geliştirilen karbendazim taşıma sisteminin çalışma prensibi(Tuna vd., 2019).

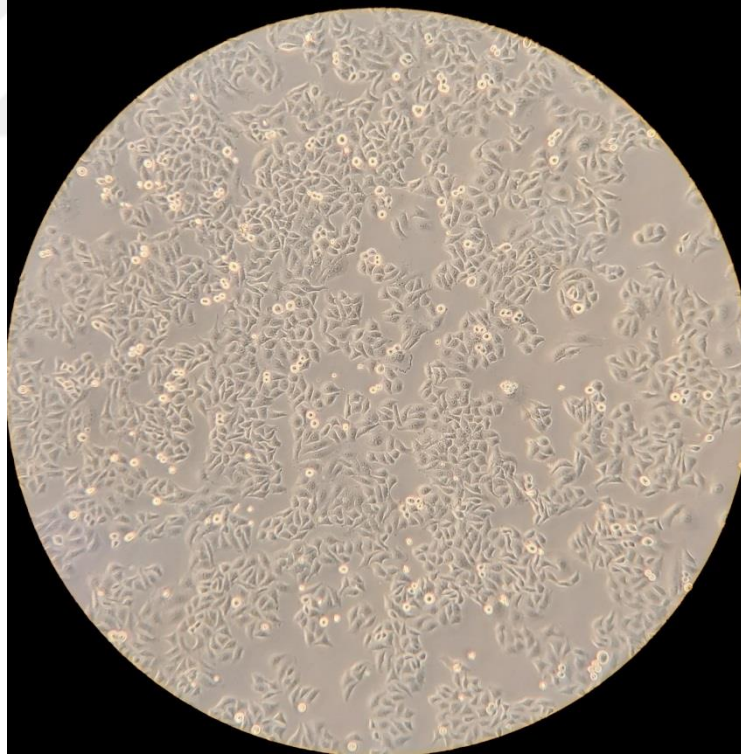
2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Servikal Kanser HeLa Hücreleri

Rahim ağzı kanseri (HeLa servikal kanseri/serviks kanseri) yeni bir hastalık olmayıp geçmişte nasıl tanımlandığı, teşhis ve tedavi edildiği tıp ve jinekoloji tarihinin bir parçası olarak incelenmiştir (Jenkins, 2020). Rahim ağzı kanseri tüm dünyada kadınlarda meme kanseri, akciğer kanseri ve kolon kanserinden sonra en sık görülen dördüncü kanser türüdür. Her yıl, yarım milyondan fazla kadına rahim ağzı kanseri teşhisi konulmakta ve hastalık dünya çapında 300.000'den fazla ölümlerle sonuçlanmaktadır (WHO, 2018; Tuna vd., 2019). 2018 yılı verilerine göre rahim ağzı kanseri, doğu, batı, orta ve güney Afrika'daki kadınlarda kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenidir. En yüksek insidans Eswatini'de kayıt altına alınmış olup kadınların yaklaşık % 6,5'inde 75 yaşından önce rahim ağzı kanseri görüldüğü rapor edilmiştir. Çin ve Hindistan küresel vakaların üçte birinden fazlasına katkıda bulunmuş, Çin'de 106.000 vakadan 48.000'i ve Hindistan'da 97.000 vakadan 60.000'i ölümlerle sonuçlanmıştır. Küresel olarak, rahim ağzı kanseri tanısında ortalama yaş 53 olup rahim ağzı kanserinden ölümlerle sonuçlanan ortalama yaş 59 olarak kaydedilmiştir. Rahim ağzı kanseri 185 ülkenin 146'sında 45 yaşın altındaki kadınları etkileyen ilk üç kanser içinde değerlendirilmiştir (Arbyn vd., 2020). Rahim ağzı kanseri ile mücadele eden ve ölümlerle sonuçlanan vakaların ortalama yaş aralığı 35-55 arası olarak belirlenmiştir. Patolojik bulgular sonucunda insan papilloma virüsünün (HPV) yaklaşık 15 genotipinden biri ile

devam eden enfeksiyonlar servikal kanser vakalarına neden olmaktadır. HPV'nin her bir genotipi, evrimsel türlere bağılı farklı kanserojen risklerle bağımsız bir enfeksiyon görevi gördüğü bildirmektedir (Schiffman vd., 2007).

Rahim ağız kanseri ile ilgili çalışmalar genellikle HeLa hücre hatları kullanılarak yapılmaktadır. Bu hücre hattı 1951 yılında izole edildikten sonra kültürde büyüyen nadir insan hücrelerinden biri olmuştur. Şekil 2.1.1'de görülen hücreler HeLa kanser hücrelerine aittir.



Şekil 2.1.1: DMEM kültür ortamında büyütülen HeLa hücrelerinin 10x oranında mikroskop görüntüsü.

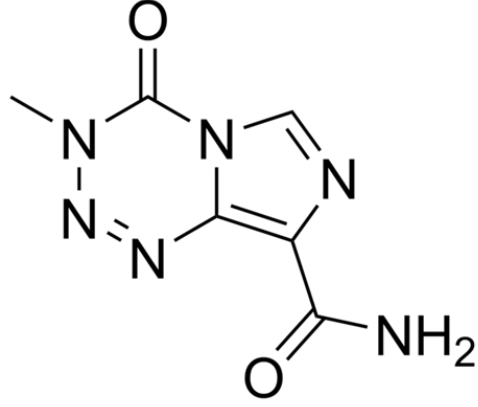
2.2. Servikal Kanser HeLa Hücreleri Tedavisi

HPV, servikal neoplazi gelişiminin merkezinde olup servikal kanserlerin %99.7 sinde tespit edilebilir. Geçmişten günümüze birçok tanı ve tedavi olanağı bulunmaktadır (Parkin ve Bray, 2006). Bu nedenle birincil olarak HPV aşısı uygulamasıyla HPV enfeksiyonunun azaltılması amaçlanmaktadır. İkincil olarak, serviks kanseri taraması ve prekanseröz lezyonların Pap test, %5 asetik asit ve/veya lugol iyot solüsyonu uygulandıktan sonra serviksin gözle muayenesi veya yüksek riskli HPV tipleri için HPV testi yapılmaktadır. Rahim ağzı kanserinin mevcut tedavileri arasında cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve çeşitli ajanlar bulunmaktadır. Günümüzde rahim ağzı tümörünün histerektomi ile cerrahi çıkarılmasıyla eş zamanlı olarak kemoradyasyon tedavisi uygulanmaktadır. Cerrahi ve kemoradyasyon gibi tedaviler metastatik ve/veya tekrarlayan tümörlerde istenilen etkiyi sağlayamadığında kemoterapi alternatif bir tedavi yöntemidir. Rahim ağzı kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar içinde platin ilaçlar, alkilleyici ajanlar, anti-neoplastik bileşiklerin kullanıldığı görülmektedir (Lee vd., 2016).

Kullanılan bu konvansiyonel yöntemlere alternatif olarak, hedefleme kabiliyetine sahip ilaçların taşınması, ilaç verimliliğini artırarak ve yan etkileri sınırlandırarak kanser tedavisi için umut vaat eden teknolojilerin kullanılması yaygınlaşmaktadır. Günümüzde genellikle monoklonal antikorlar ve aptamerler, hedefli kanser tedavisi için yüksek spesifiteye sahip olduğu yakın zamanda yapılan çalışmada gösterilmiştir (Tuna vd., 2019).

2.2.1. Klinikte kullanılan bazı kemoterapötik ajanlar

Bevacizumab (Avastin®); anjiyojenik VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü) proteinini bloke etmek için kullanılan ve rekombinant insanlaştırılmış monoklonal antikor olan FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) onaylı anti-anjiyojenik ilaçlar arasında yer almaktadır. Metastatik, tekrarlayan ve kalıcı serviks kanserinde kombine ilaç tedavisi ile ciddi toksisiteye neden olarak hasta sağ kalımını sağlamaktadır (Bizarri vd., 2016 ; Lee vd., 2019). Bevacizumab'ın kimyasal yapısı şekil 2.2.1.1'de görülebilir.

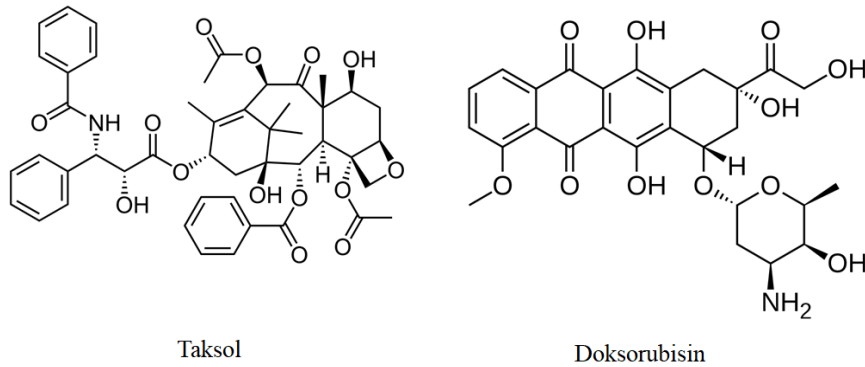


Bevacizumab

Şekil 2.2.1.1: Bevacizumab kimyasal yapısı

Paklitaksel (Taxol®); *Taxus Brevifolia* bitkisinden izole edilmiş olan, hücre döngüsünü durduran, mikrotübülleri stabilize ederek hücre bölünmesinde hücre ölümünü indükleyen FDA onaylı anti kanser ilaçtır (Isah , 2015 ; Zhang vd., 2016). Metastatik ve tekrarlayan serviks kanserinde her hastaya uygun ve etkili olmadığı bildirilmiştir. Kabul edilebilir bir toksisiteye sahip olup halen klinik tedavilerde kullanılmaktadır (Pectasides vd., 2009). Paklitaksel (Taksol) bitki alkoloidlerinden biridir ve kimyasal yapısı şekil 2.2.1.2’de gösterilmiştir.

Doksorubisin (Adriamycin); *Streptomyces* bakterisinden ekstrakte edilen ve birçok kanser türünün tedavisi için kullanılan antrasiklinler sınıfından kemoterapötik bir ajandır. Belirli transkripsiyon faktörlerine etki ederek etkinliğini göstermektedir. Halen kanser tedavilerinde kullanılıyor olmasına rağmen kardiyotoksik etkisi kullanımını sınırlandırmaktadır (Patel vd., 2012 ; Wakharde vd., 2018). Doksorubisin, daunorubisinin 14-hidrosil formudur ve hidrofobik yapıdadır (Şekil 2.2.1.1).

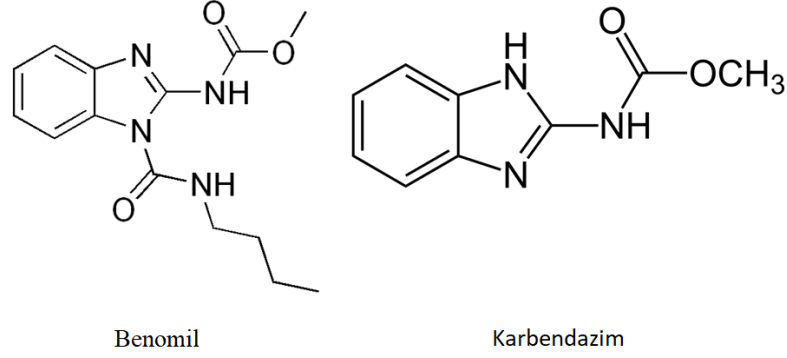


Şekil 2.2.1.2: Taksol ve doksorubisinin kimyasal yapısı

2.2.1.1. Karbendazim

Benomil ve karbendazim gibi bir takım benzimidazol türevlerinin, tarımsal fungusitlerin yanı sıra veteriner ilaçları olarak da potansiyel rolleri bilinmektedir. Aynı zamanda, karbendazimin memeli tümör hücrelerinde özellikle p53 hücre hatları, ilaç ve birçok ilaca dirençli hücre hatlarının proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Mantar ve memeli hücreleri ile yapılan çalışmalar, karbendazimin hücrelerin proliferasyonunu inhibe etme potansiyel rolünü vurgulamış ve böylece kansere karşı terapötik çıkarımlar göstermiştir (Yenjerla vd., 2009 ; Goyal vd., 2018). Karbendazim, geniş spektrumlu bir fungusit olması yanında ayrıca faz II klinik öncesi çalışmaların altında olan üreme ve gelişimsel toksik madde olarak ümit verici bir deneysel anti tümör ilacıdır (Tuna vd., 2019).

Karbendazim ($C_9H_9N_3O_2$) benzimidazol yapıda bir benomil metabolitidir (Şekil 2.2.1.1.1). Moleküler ağırlığı 191.18 g/mol, yoğunluğu 270 kg/m^3 olan karbendazimin IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) ismi Methyl 1H-benzimidazol-2-ylcarbamate'dir.



Şekil 2.2.1.1.1: Benomil ve karbendazimin kimyasal yapısı.

2.3. Servikal Kanser HeLa Hücrelerinde Hedef Bölgeye Nanopartikülün Taşınımı

2.3.1. Nanopartiküller

“Nano” kelimesi Latince kökenli bir kelimedir ve cüce anlamına gelmektedir. Mezopotamya bölgesindeki insanlar 4.500 yıldan daha uzun süredir doğal yöntemler ile saç boyasında, seramik matrislerde, cam-kuvars karışımı sentetik pigmentlerde nanopartikülleri (NP) kullanmışlardır. Geçmişten günümüze birçok alanda ve birçok şekilde kullanılmaya devam etmektedir. NPler, 1-1000 nm büyüklüğünde ve 1 ila 100 nm çapında malzemeler olarak tanımlanır. NP; ayarlanabilir fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinden dolayı muadillerine göre daha yüksek performansla teknolojik ilerlemelerde ön plana çıkmıştır. NP boyutlarına, bileşimlerine, şekline ve

kökenlerine bağlı olarak kategorize edilir (Jeevanandam vd., 2018). Terapötik uygulamalardaki nanopartiküllerin biyoyumlu, biyobozunur ve toksik olmaması gerekir. Vücutta, nanopartiküllerin yükü genellikle difüzyon, şişme, erozyon veya bozulma ile serbest kalır. Nanopartiküllerin ilaç dağıtımındaki en büyük avantajları, geniş genel yüzey alanı, yüksek yükleme kapasitesi ve düşük viskozitede yüksek katı içerik dağılımlarıdır (Ozalp vd., 2011). NP; hedef moleküllere yüksek duyarlılıkta, hızlı ve hassas olarak yönlendirilebilme avantajına sahip olup ilaç-ilaç uygulamaları, imalat ve malzeme uygulamaları, çevresel, elektronik ve enerji uygulamalarında büyük rol almaktadır (Ozalp ve Schäfer, 2011 ; Ercan vd., 2012).

NPlar oluşturulduğu materyalden dolayı uzun süreli maruziyette toksisiteye neden olabilmektedir. Bunu engellemek adına biyobozunur olmalı ya da vücuttan kolayca atılabilmelidir. Ayrıca hedef bölgeye gittiğinden emin olunması için belirli bir plan dahilinde NPnin geçtiği hücre ve dokular göz önünde bulundurulmalıdır ve buna yönelik modifikasyonlar yapılmalıdır (Huang vd., 2017).

2.3.1.1. Mezoporöz silika nanopartikül

Mezoporöz silika nanopartiküller (MSN); 2 nm ila 6,5 nm çaplarına sahip, düzenli silindirik mezo gözenekli, işlevselleştirilebilen biyoyumluluk ve yüksek yükleme boşluğu gibi fizikokimyasal özelliklere sahip moleküllerdir. Bu özellikleri MSNlere etkili kapsülleme ve biyomedikal uygulamalar için biyoaktif moleküllerin

hücre içi verilmesinin kontrollü bir şekilde salım özelliği sağlamaktadır (Silaghi vd., 2014).

Son yıllarda; sıcaklık, pH, redoks, ışık, ultrason, manyetik veya elektrik alanları, enzim, redoks, ROS, glikoz ve ATP veya bunların kombinasyonları gibi çevredeki uyaran değişikliklerine yanıt veren fonksiyonelleştirilmiş MSNler; ilaç dağıtımı, hastalık teşhisi, tıbbi görüntüleme ve doku rejenerasyonu gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Thi vd., 2019).

2.4. Servikal Kanser HeLa Hücrelerinde Hedef Bölgenin Tanınması

Klinikte kullanılan paklitaksel kemoterapötik ajanı birçok kanser türünün tedavisinde kullanılmaktadır. Fakat kemik iliği baskılanması ve sinir hasarı gibi yan etkilere neden olduğu bildirilmiştir. Doksorubisin de birçok kanser türünün tedavisinde etkili olmasına rağmen direnç kazanımı ve birçok organda ve özellikle kalpte zayıflatıcı etkiye sahip olduğundan kullanımı sınırlandırılmaktadır. Her iki ajan da sağlıklı doku ve kanserli dokuyu ayıramadığından kullanımı sınırlandırılmaktadır (Marupudi vd., 2007 ; Mohajeri ve Sahebkar,2018). Bu nedenle hedefe yönelik tedavi, sağlıklı hücelere zarar vermeden tümör mikro çevresine en yüksek ilaç konsantrasyonunu sağlamayı amaçlamaktadır. Hedefe yönelik tedavi ile ilaçların azalan yan etkilerine ek olarak kemoterapötik maddeye karşı direnç gibi problemler de çözülebilir (Masoud ve Pagès, 2017). Protein bazlı monoklonal antikorlar ve tek sarmallı oligonükleotit bazlı

aptamerler, servikal kansere karşı hedefli tedavide kullanılacak en umut verici ajanlar arasındadır. Ayrıca, bu ajanlar hedeflerini *in vivo* olarak belirleme yetenekleri nedeniyle kanser tanısı için de kullanılabilceği yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (Sun vd., 2014 ; Zhang vd., 2014).

2.4.1 Monoklonal antikorlar

Antikorlar, 1890 yılında difteri toksinini kanda nötralize eden bir tür maddenin olduğu belirlenmesiyle bilimsel çalışmalarda yer edinmeye başlamıştır. Daha sonra bir toksinin diğerine göre özgülüğü olduğu belirlenen maddeye antikor adı verilmiştir. Antikor oluşumunu indükleyebilen madde farklı isimlendirmelerden sonra antijen olarak adlandırılmıştır. Bu antijen-antikor ilişkisi sadece insan vücudundaki bağışıklık sistemi mekanizmasını karşılamayıp modern immunojenik metodolojisini ve tekniğinin de temelini atmıştır. Antikorlar, immünoglobulinler (Ig) olarak adlandırılan B hücreleri tarafından salgılanır ve beş izotip halinde gruplandırılırlar: IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM. Bu sınıflar arasında en bol bulunan, genellikle immünoglobulinlerin tipik yapısı olarak örneklenen IgG'dir (Liu, 2014 ; Chung , 2017).

Monoklonal antikorlar, belirli hedeflere karşı tek ana hücreden kaynaklanan bağışıklık hücreleri tarafından üretilen immünoglobulin şekilli proteinlerdir (Kohler ve Milstein, 1975). Boyutları yaklaşık 150 kDa (kilo dalton)'dur. Monoklonal antikorlar hedeflerindeki belirli aminoasit aralığını tanırlar ve hedef alanları epitop olarak

adlandırılır. FDA tarafından onaylanmış elliden fazla monoklonal antikor bazlı ilaç bulunmaktadır (Liu, 2014; Chung, 2017).

2.4.2. Aptamerler

Aptamerler, latince “uygun” anlamına gelen *aptus* ve bir kısmı anlamına gelen *meros* terimlerinden köken almaktadır. Antikorlara benzer şekilde üç boyutlu bir konformasyona katlanarak protein hedeflerine bağlanan tek zincirli 20-100 nükleotit (nt) ve 8-25 kDa aralığında uzunluğunda değişen deoksiribonükleik asit (DNA) veya ribonükleik asit (RNA) molekülleridir (Nimjee vd., 2017). Tarihte 1960 yılında Spiegelman ve arkadaşlarının nükleik asit çalışmaları ile başlamış ve 1990larda üç farklı araştırma grubunun aynı zaman diliminde aptamer çalışmaya başlamasıyla devam etmiştir (Bayraç, 2014). Yüksek seçicilik ve hedeflere yüksek duyarlılık nedeniyle, aptamerler, gıda güvenliğini sağlama, çevre izleme, hastalık teşhisi ve terapiye kadar çeşitli uygulamalarda moleküler prob olarak önemli bir potansiyele sahiptir (Zhong vd., 2020). Ek olarak, aptamerler siRNA'ları, kemoterapötik ajanları, hücre toksinlerini ve nanopartikülleri içeren yeni yapılara dahil edilmiştir, burada terapötik kargo için taşıyıcı ajanlar olarak işlev görmüşlerdir (Barbas vd., 2010).

Hücre yüzeyi biyobelirteçleri belirlemek, aptamerler geliştirmek veya ilgilenilen bir hedefe özgü aptamerler geliştirmek için kullanılan metodoloji üstel zenginleştirme ile ligandların sistematik evrimi (SELEX), tekrarlayan bir çoğaltma ve zenginleştirme

sürecine dayanmaktadır (Sun vd., 2014). SELEX, büyük bir kombinatoriyal çift sarmallı oligonükleotit kütüphanesinden, tekrarlayan bölüm ve çoğaltma turları ile değişken DNA bağlanma duyarlılıkları ve özgüllüklerine sahip DNA ligandlarının aşamalı seçimini içeren deneysel bir prosedürdür (Chai vd., 2011). Aptamer, SELEX ile büyük bir oligonükleotit kütüphanesinden seçilir. Bu aşamalı süreçle, bağlayıcı olmayan aptamerler atılır ve önerilen hedefe bağlanan aptamerler genişletilir. İlk pozitif seçim turlarını bazen negatif seçim izleyebilmektedir. Bu, ortaya çıkan aptamer adaylarının seçiciliğini geliştirir. Asıl amaç ortamda aptamere spesifik olan dizileri seçip diğerlerini elemektir (Zhong vd., 2020).

2.4.2.1. AS1411 aptameri

5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3' sekanslı AS1411 aptameri; kanser hücrelerinin yüzeyinde yüksek seviyelerde bulunan, ancak normal hücrelerin yüzeyinde bulunmayan nükleolin proteinini hedefleyen bir aptamer olarak işlev görür. Guanin nükleotiti açısından zengin olan AS1411, sentetik 26 bazlık bir DNA oligonükleotitidir ve proliferasyonu önleyici etkisi keşfedilmiştir (Yazdian-Robati vd., 2019).

Nükleolin yani C₂₃ nükleusun en bol ribozomal olmayan fosfoproteinlerinden biridir (Yazdian-Robati vd., 2019). Hücrenin hayatta kalması, büyümesi ve çoğalmasında temel rol oynayan çok işlevli bir proteindir (Carvalho vd., 2019). Protein

öncelikle normal hücrelerin çekirdeğinde lokalize olurken, kanser hücrelerinde sitoplazmada ve hücre yüzeyinde de bulunduğu gösterilmiştir (Mongelard ve Bouvet, 2007). Bu özellik, tercihen kanser hücrelerinin yüzey nükleolininin dış alanını hedefleyen AS1411'e tümör seçici bir davranış kazandırır. Bu nedenle, tanı ve kanser tedavisi için potansiyel bir hedef olarak kabul edilir. AS1411, yüksek hücresel alım etkinliği ile serum nükleazlarına ve pH dalgalanmalarına karşı daha kararlı hale getiren oldukça polimorfik guaninli dört katlı yapıya katlanabilir. AS1411 kararlı yapısı ve biyolojik özellikleri, özellikle AS1411 uygun pozisyonlarda deoksिनükleotitler üzerinde kimyasal modifikasyon yoluyla iyileştirilmesi, aynı zamanda aptamer terapötik fonksiyonunu geliştirmek için bir strateji olabilmektedir (Bates vd., 2017).

2.4.2.2. Aptamerlerin avantajı

Aptamerler, antikorlara benzer şekilde özel bir üç boyutlu yapıyı tanıyarak hedefleriyle etkileşime girer ve bu nedenle “kimyasal antikorlar” olarak adlandırılır. Protein antikorlarının aksine, aptamerler oligonükleotit özelliklerine göre önemli kimyasal ve biyolojik özellikler sunmaktadır. Bu nedenle, yeni klinik uygulamaların geliştirilmesi için daha uygundur. Antikora göre 10 kat daha küçüktür. Analitik amaçlar için fizyolojik olmayan koşullar altında kullanılabilirler. Antikorlar gibi immünojenik değildirler ve *in vivo* uygulamalarda da kullanılabilirler. Aptamerler termal olarak kararlıdır; 95°C denatürasyondan sonra bile oligonükleotitlerin kendine özgü özelliklerine dayanarak, aptamerler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra doğru üç boyutlu konformasyonlarına yeniden dönebilirler. Buna

karşılık, protein bazlı antikorlar yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini kalıcı olarak kaybederler (Hidding, 2006 ; Sun vd., 2014). Aptamerlerin antikorlara göre bir diğer avantajı da özellikle elektrokimyasal sensörler gibi elektrik sensörlerinde veya alan etkili transistör kullanımlarında görülmesidir. Böylece biyosensör uygulamalarında kullanılabilirliği vurgulanmaktadır (Lee vd., 2008).

2.4.2.3. Aptamerlerin dezavantajları

Aptamer geliştirme ve uygulama engeline iki ana engel atfedilmektedir. Birincisi, SELEX süreci hala zaman alıcıdır ve başarılı oranlar düşüktür. İkincisi, mevcut aptamerlerin çoğu *in vitro* olarak elde edilir ve *in vivo* işlev gösterip gösteremeyecekleri açıklanmalıdır. Bunların yanında ısı ile sterilize edilemezler, hedefe yönelik yakın zamanda aptamer olmayabilir ve nükleaz aktivitesinden etkilenebilirler (Hidding, 2006).

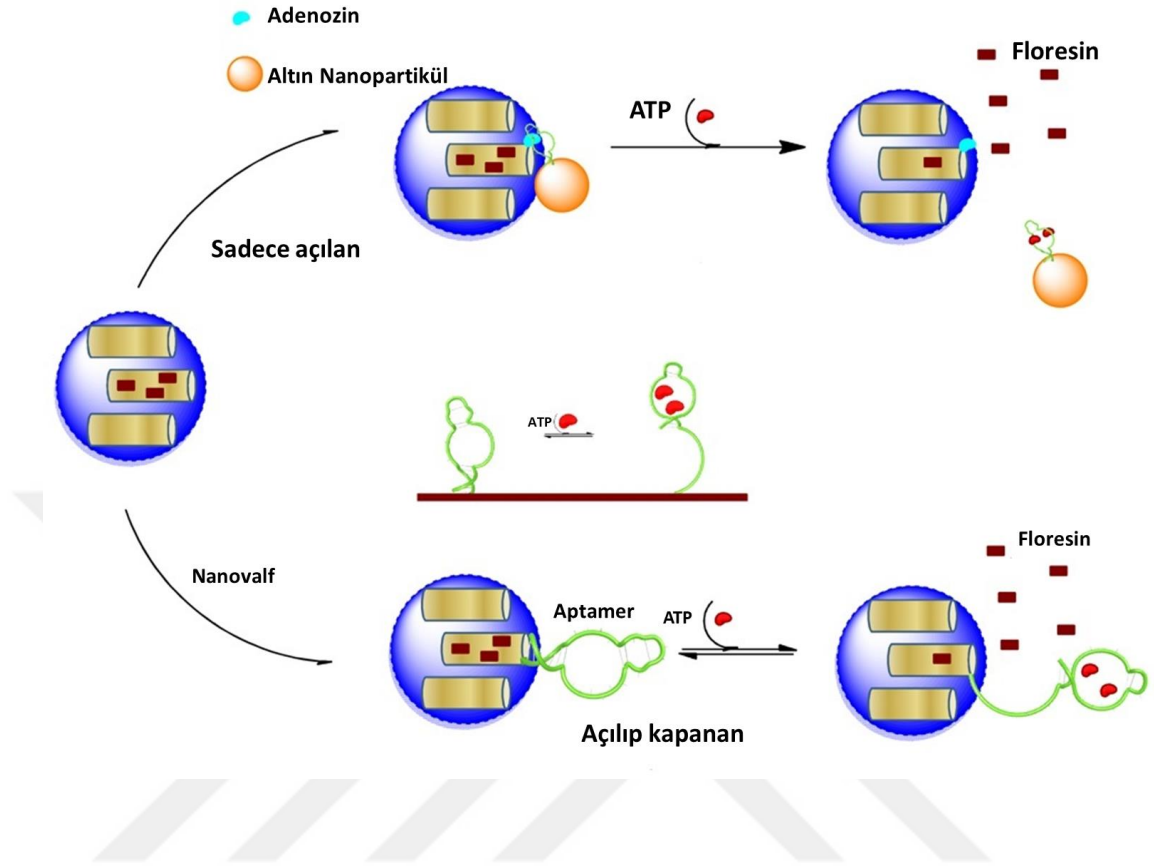
2.4.2.4. Moleküler kapı yapısındaki aptamerler

Aptamer kapı yapıları, aptamer oligonükleotit dizilerinin moleküler kapı olarak bir nano-gözenekten molekül geçişini kontrol etmesinde kullanılabilmiştir. Diğer kapı moleküllerinin aksine evrensel bir kapı yöntemi sunmaktadır. Seçilen herhangi bir aptamer dizisi kapıya dönüştürülebilir ve aptamerler istenilen her hedefe seçilebilir. Halbuki aptamer haricindeki kapı moleküllerinde her bir uygulama için farklı bir

materyal ve mekanizma bulunma zorluğu vardır ve bu yüzden kullanımları yaygınlaşmamaktadır. Aptamerlerin bir nanopartikülün içinden iyon akışını etkilemesi, öncelikle elektrokimyasal yöntemlerle birleştirilerek sensörler yaratılmıştır (Abelow vd., 2010).

Cam yüzey üzerinde açılmış 20 nm çaplı ve konik şekilli nano odacıklar kokain tanıyan aptamer molekülleri ile kapatıldığında ve açıklığın geniş alt kısmına disk şeklinde bir platin elektrot yerleştirildiğinde, kokain miktarına göre değişen sinyal elde edilmiştir. Böylece redoks aktif moleküllerin nano çaplı açıklıklardan geçişinin aptamer moleküllerinin hedeflerine bağlanmasıyla oluşan konformasyon değişikliklerine göre kontrol edildiği kanıtlanmıştır. Daha sonra bu prensip mezo yapı silika nano açıklıklara uygulanarak florasan gibi düşük ağırlıklı moleküllerin bu nano alanlara hapsedilmesi ve aptamer hedefin varlığında dışarıya salınmasını sağlayan sistemler geliştirilmiştir. ATP aptamer dizileri kullanılarak florasan doldurulmuş silika partiküllerinin ATP molekülleri, solüsyona eklendiğinde nano ağızları açtığı ve florasanların dışarıya salındığı gösterilmiştir (Zhu vd., 2011). Yine florasan dolu silika nanopartiküller yüzeye kovalent bağlı aptamer molekülleri ile hapsedilerek bu sefer ATP moleküllerinin konsantrasyonuna göre açılıp kapanan nanovalf tipi aptamer kapıları yayınlanmıştır (Özalp vd., 2011). Şekil 2.4.2.4.1 bu iki tür aptamer-kapı örneğini çizimler aracılığıyla anlatmaktadır. Bu tasarımın en büyük avantajı ortamdaki hedef molekülün konsantrasyonunun değişmesi durumunda bu değişikliğe göre kargo molekülün salınımının değişmesidir (Abelow vd., 2012). Sadece bir defa açılan aptamer kapılı sistemlere örnek olarak trombin proteini ölçen bir aptamer kapılı silika sensörü

yayınlanmıştır (Oroval vd., 2013). Bu çalışmada rodamin florasan molekülleriyle doldurulan silika nano kompozitlerin, yüzeylerinde artı yüklü kimyasal gruplar oluşturarak (amino grupları), eksi yüklü (fosfat grupları nedeniyle) aptamerlerin yüzeyde sabitlenmesi ve florasan moleküllerini hapsedmesine neden olur. Ortamda trombin proteini varlığında aptamer moleküllerinin trombine afinitesi çok güçlü olduğundan nano kompozitlerin yüzeylerini terk eder ve florasanın ortama salınmasına neden olur. Ortamdaki florasan artışının izlenmesiyle trombin miktarını ölçen bir sensör elde edilmiştir. Nükleik asit kapı prensibi ile DNA tanısı yoluyla mikroorganizma sensör prensibi son zamanlarda bir makale ile gösterilmiştir. Burada genomik DNA hibridizasyon prensibiyle çalışan bir DNA kapılı silika nanopartikülüne bağlanarak *Mycoplasma* tayini 70 genomik kopya düzeyinde gösterilmiştir(Climent vd., 2013).



Şekil 2.4.2.4.1: Mezo-gözenekli silika ve ATP aptamer sekansları ile hazırlanmış geriye kapanmayan (üstte) ve açılıp-kapanan (altta) moleküler kapı örnekleri (Ozalp'ten 2011). ATP hedef moleküllerinin ortamdaki varlığına göre floresans molekülleri nano gözeneklerde hapsolüyor veya dışarı salınıyor.

Aptamer kapı sistemlerinin biyosensör geliştirmesinden başka birçok ilaç taşıma sistemleriyle kullanıldığı örnekler mevcuttur. Bunlar içinde mezo-gözenekli silika en fazla kullanılan nano taşıyıcı olmuştur. Altın nanopartikülleri üzerine sentezlenen kabuk mezo gözenekli silika içerisine florasan molekül yükleyerek AS1411 aptamer dizisini kapı olarak kullanılmış ve kanser hücrelerine hedefli ve kontrollü salınımı gösterilmiştir. Benzeri bir çalışma da florasan molekülleri AS1411 aptamer kapıları kullanılarak MCF7 meme tümörü hücrelerine ve insan servikal kanser hücrelerinde

(HeLa) hedeflenmiştir (Tuna vd., 2019; Hernandez vd., 2013). Antikanser ilaç doksorubisin silika partiküller içerisinde MUC-1 aptamer dizisi kapı yapısına değiştirilerek hapsedilmiş ve meme kanseri hücrelerine yönlendirilerek sitotoksik etkileri gösterilmiştir (Pasqual vd., 2017). Yine başka bir çalışmada aptamer kapı yapıları antibiyotik hedeflemesi için de kullanılabileceği gösterilmiştir. Vankomisin ile doldurulmuş silika nanopartiküllerin mezo gözenekleri *Staphylococcus aureus* patojenine spesifik olarak bağlanan aptamer dizisinden elde edilen moleküler kapılarla kapatılmış ve sadece *S. aureus* için minimum inhibisyon değerlerinin (MIC) 2 kat azaltıldığı fakat *S. epidermis* için MIC değerinin arttığı gösterilmiştir (Borsa vd., 2016).

3.YÖNTEM

3.1. Aptamer Kapısı

Bu çalışmada kullanılan AS1411 aptamer kapısı (5'-CCA CCA CGG TGG TGG TGG TTG TGG TGC GTG GTG G-3') Hernandez ve arkadaşlarının (2013) yayınından belirlenmiş olup Sentromer Ltd. (İstanbul, Türkiye) tarafından 5' amino grubu fonksiyonelleştirmesi ile nükleolin aptamerin 5' ucuna 7 nükleotid eklenerek sentezlenmiştir.

3.2. Karbendazim Yüklü Aptamer Silika Nanopartikülleri

Mezoporöz silika nanopartiküller, bir sol-gel yöntemine göre sentezlenmiştir (Yurdakul vd., 2019). 2.74 mmol 1 gram (g) N-cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) çözeltisi ile 400 miligram (mg) sodyum hidroksit (NaOH) tartılıp 480 mililitre (mL) deiyonize su ile karıştırılmıştır. Karışım önce vortekslenmiş sonrasında ise bir dakika sonike edilmiştir. Sonrasında içerisine karıştırıcı balık koyulup ısıtılmış ve sıcaklık 70 °C'de tutulmuştur. Sürekli karıştırılarak, 5 dakika içinde 30 saniyede bir 166 µl, son 30 saniyelik kısmında da 186 µl olmak üzere karışıma toplamda 5 mL 22,4 mmol tetraetoksilan (TEOS) damla damla ilave edilmiştir. 2 saat sonra reaksiyon, beyaz çökelti topraklarla toplanmış, birkaç kez yaklaşık 200 mL su ve 20 mL metanol ile dönüşümlü yıkanmış, ardından hava altında kurutulmuştur. 1.5 g sentezlenmiş üründen

gelen CTAB şablonu, 150 mL metanol çözeltisi içinde yeniden akıtılarak elde edilmiştir. 6 saat sonra ürün karıştırılmış, yaklaşık 20 mL metanol ve 50 mL su ile dönüşümlü yıkanmış, kurutmadan sonra tamamen yüzey aktif madde içermeyen serbest silisli nanopartiküller elde edilmiştir. Nanometrik görüntüleme için Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM), iç-dış yüzey alanı ve gözenek boyutu için (BET) yöntemi uygulanmıştır (ILTEK, Konya, Türkiye).

Sentezlenen partiküller, karbendazim ile benzer molekül ağırlığı olan diğer küçük moleküller için gece boyunca 100 mM PBS içinde karbendazim içerisinde inkübe edilmiştir. Partiküller, 3-glisidiloksipropil TEOS ile silanizasyon prosedürü ile epoksi grupları ile aşılansmıştır. Son olarak, 10 mM amin etiketli nükleolin aptamer geçit dizileri, pH 9.4'te bir karbonat-bikarbonat içerisine immobilize edilmiş ve üç kez PBS ile yıkanmıştır (Hermanson, 2013). 100 mMde karbendazim, yıkama hariç tüm hazırlık prosedürlerinde kullanılmıştır. Karbendazim yüklü aptamer silika nanopartikülleri UV-Vis spektroskopisi (EPOCH-2, BioTek, USA), dinamik ışık spektroskopisi (DLS) (ZetaSizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK) ve Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılarak karakterize edilmiştir.

3.3. Nükleolin Aptamer kaplı Silika Eşleniklerinin Hücre Kültürü Ortamı

HeLa rahim ağzı kanseri hücre dizisi (ATCC-CCL2); % 10 ısı ile inaktive edilmiş FBS (Fetal bovine serum), % 0,1 penisilin ve streptomisin ile desteklenmiş DMEM ((Sigma Aldrich, Almanya) içerisinde hücre kültürü T25'lik şişelerinde (TPP, İsviçre) muhafaza edilmiştir. 37°C'de nemlendirilmiş %5 CO₂ atmosferinde inkübe edilerek ve hücreler yaklaşık %80 birleşme noktasına ulaştığında her 72 saatte bir alt kültürlenmiştir.

3.4. AS1411 Aptamerinin Hela Hücrelerine Bağlanması

AS1411 (nükleolin aptamer) alımını teyit etmek için, 4×10^4 HeLa hücreleri 24 kuyucuklu plakalar (TPP, İsviçre) eklenmiş ve ertesi gün yukarıda tarif edilen koşullarda 4 saat boyunca 1 mM FAM (Fluorescein amidite) etiketli AS1411 (FL-AS1411) ile inkübe edilmiştir. 4 saat sonra, hücreler %0.25'lik tripsin (Thermo, İngiltere) muamelesiyle ayrılmış ve üç kopyalarda (Cyte™5, Merck Millipore) akış sitometrisinde anında analiz edilmek üzere 100mL'lik PBS (VWR, İngiltere) ile yıkanmıştır.

3.6. WST-1 Hücre Proliferasyon Deneyi

Sitotoksosite derecesini değerlendirmek adına canlı hücreleri saymak için bir hücre proliferasyon analizi CCK-8 (Cell Counting Kit-8, Sigma) kullanılmıştır. 96 kuyucuklu hücre kültürü mikrolakasına 10^4 HeLa hücresi eklenmiştir. 24 saat sonra karbendazim (karb), silika nanopartiküllerine (SNP'ler) veya karbendazim aptamer silika nanopartiküllerine (karb-Apt-SNP'ler) maruz kaldıktan sonra her bir kuyucuğa CCK-8 reaktifi ilave edildi ve tetrazolyum tuzlarının formazan boyasına dönüşümü ELISA mikrolaka okuyucu (EPOCH-2, BioTek, USA) ile 440 nm dalga boyunda absorbans değerleri alınarak tespit edilmiştir.

3.7. Apoptoz / Nekroz Analizi

Tedavi sonrası apoptotik veya nekrotik hücrelerin analizinde Annexin V-FITC (Calbiochem, Merck Millipore) kullanılmıştır. Kısaca, 4×10^4 HeLa hücreleri 24 kuyucuklu hücre kültürü mikrolakalarında büyütülmüştür. Serbest karbendazim veya karb-Apt-SNP'lerle inkübasyondan sonra, hücreler tripsinize edilmiş ve süpernatandaki ayrılan hücreler yeni bir tüpte toplanmıştır. Santrifüjleme ($1000g \times 5$ dk, Eppendorf) sonrasında hücreler Annexin V-FITC ve PI (Invitrogen) ile kullanım kılavuzundaki prosedür izlenerek boyanmıştır. Numuneler bu prosedür boyunca $+4^\circ C$ 'de tutuldu. Her örnek için guava easy-Cyte™ 5 (Merck Millipore) akış sitometrisinde 20.0000'den fazla üçlü kopya elde edildi.

3.8. İstatistiksel Analiz

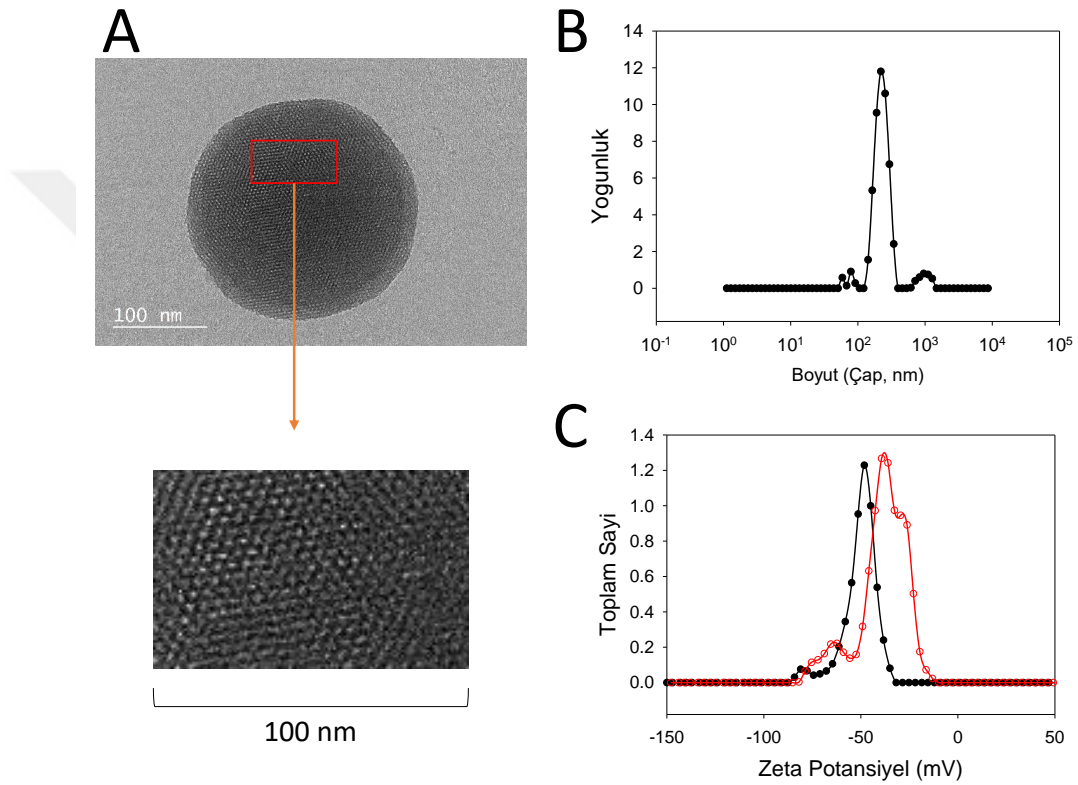
Ölçümler ortalama T standart sapma olarak verildi ve istatistiksel analiz paketi SPSS (Versiyon 25, ABD) kullanılarak analiz edildi. Grup çiftleri arasındaki benzerlikleri test etmek için Student's t testi kullanılmış ve Dunnett t3 veya Dunnett-t çoklu gruplar için tek yönlü varyans analizi ANOVA (Analysis of Variance) kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için kesim olarak $p < 0.05$ düzeyi kullanılmıştır. IC₅₀ (%50 oranında inhibitör konsantrasyonu) değerleri, eğrilerin yerleştirilmesiyle elde edilen ilişki denklemlerinden Sigmaplot'un (Versiyon 9.0.1, ABD) üstel büyüme 2 parametrelerine %50 sinyal olarak hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. Karbendazim Yüklü Silika-Aptamer Nanopartiküllerinin Fonksiyonel Karakterizasyonu

Karbendazim yüklü silika aptamer nanopartikül sisteminin oluşturulabilmesi için öncelikle mezopor silika nanopartikülleri literatürdeki metotlara göre sentezlenmiştir. Sol-gel metodu kullanılarak MCM-41 tipi (Mobil Composition of Matter No. 41) düzenli hegzagonal mezoporları olan partiküllerin sentezlediğinin görülebilmesi ve karakterize edilebilmesi için Transmisyon Elektron Mikroskopi (TEM) ve Dinamik Işık Saçılımı (DLS) spektroskopisi analizleri kullanılmıştır. Şekil 4.1.1-A'da tipik bir partikülün TEM analizi sonucu görülmektedir. Sentezlenen silika nanopartiküllerinin yuvarlak şekilli bir morfolojisi olduğu ve 200 nm civarında çapa sahip olduğu saptanmıştır. Partikül yüzeyine daha yakından bakılınca (alttaki figür) hegzagonal düzenli mezoporların varlığı görülebilmektedir. Partiküllerin hidrodinamik çap boyutu 221 ± 8.4 nm olarak DLS analizi ile saptanmıştır (Şekil 4.1.1-B). Partiküllerin çoğunun 95 ile 150 nm arasında büyüklükte görüldüğü gibi bir dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküller karbendazim ile inkübe edilerek yüklendikten sonra epoksi grupları ile kaplanmıştır. Nanopartiküllerin epoksi kaplamadan önceki yüzey yükü ortalama -15 mV değerinden epoksi kaplaması sonucu -38.3 mV değerine düşmektedir. Epoksi kaplı nanopartiküller 5'-amino işaretli AS1411 aptamer kapıları ile kaplandıktan sonra ise zeta potansiyel değerleri ortalama -48.4 mV değerine ulaşmaktadır (Şekil

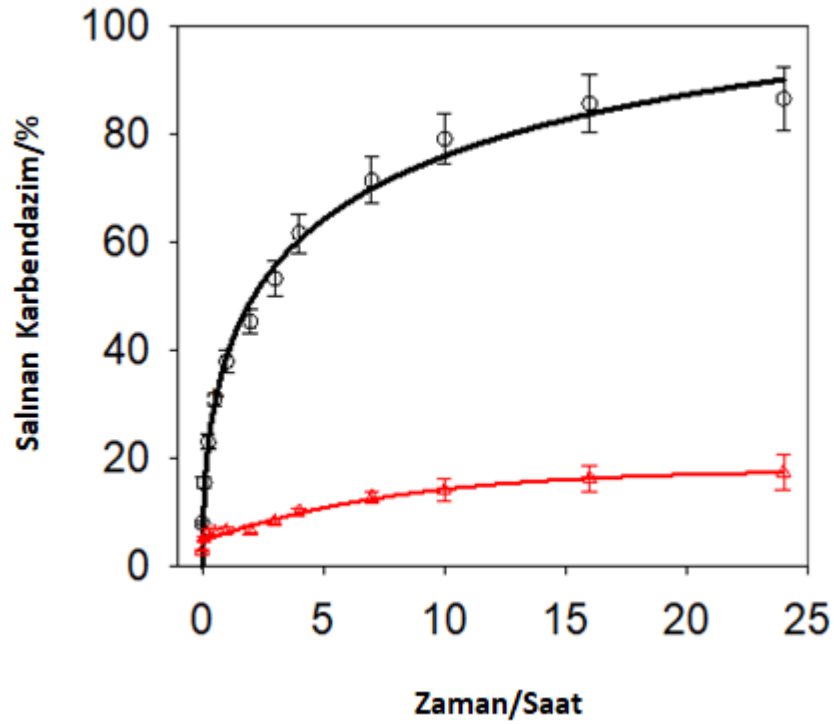
4.1.1-C). Epoksi kaplı nanopartiküllerin yüzey potansiyel değerleri -12 mV ile -53 mV arasında değiştiği tespit edilmiştir. Aptamer kapı kaplandıktan sonra yüzey potansiyel aralığı ise -32 mV ile -68 mV değerleri arasında değiştiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1.1: Sentezlenen silika nanopartiküllerin karakterizasyonu.

Kullanılan materyalin fiziksel karakterizasyondan sonra fonksiyonel olarak denemeler yapılarak her mg Karb-Apt-SNP için 53 ± 8.2 nmol karbendazim yüklemesi yapıldığı spektroskopik ölçümlerden hesaplanmıştır. Nano gözeneklerde hapsedilmiş karbendazimin aptamer hedefi nükleolin varlığında nasıl salındığı Şekil 4.1.2'de

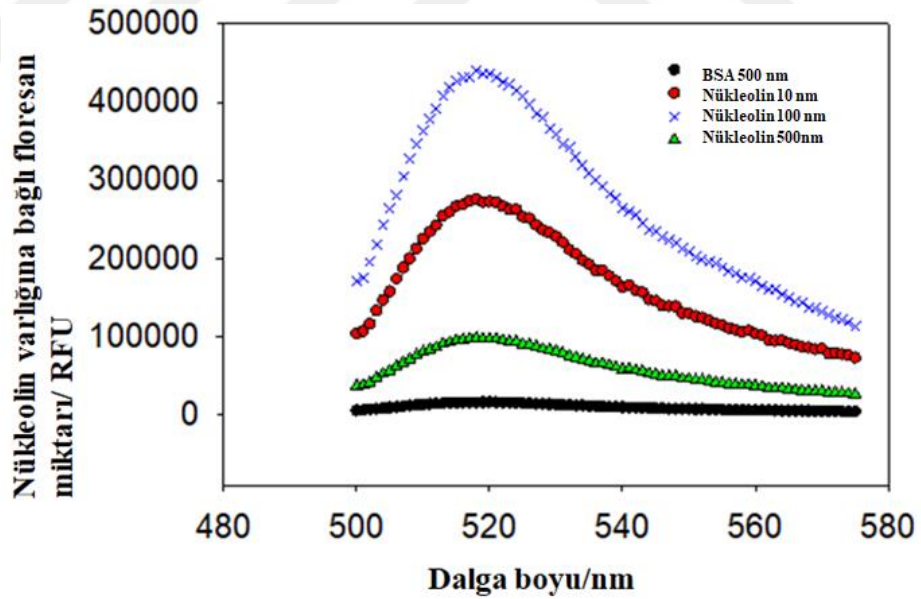
gösterilmiştir. Aptamer hedef molekülü olan nükleolin proteini olmadığında Karb-Apt-SNP için 1 gün içerisinde % 17.4 ± 3.2 karbendazim salımı görülmektedir. İlk 5 saatte %10.1 karbendazim salımı tespit edilmiştir. Benzer bir salım deneyi 1 μM nükleolin proteini eklendikten sonra tekrar edildiğinde 24 saat içerisinde partiküllerde hapsedilmiş karbendazimin % $86,5 \pm 5.8$ oranında salım yaptığı görülmüştür (Şekil 4.1.2, siyah çizgi). Şekilde görülebileceği gibi ilk 5 saate % 64.5 oranında, ilk 2 saatte ise %50.1 oranında karbendazim salımı yapılan çalışmada tespit edilmiştir.



Şekil 4.1.2: Karb-Apt-SNP partiküllerinden fosfat tamponu içerisinde (kırmızı çizgi) veya nükleolin proteini varlığında (siyah çizgi) karbendazim salım kinetiği.

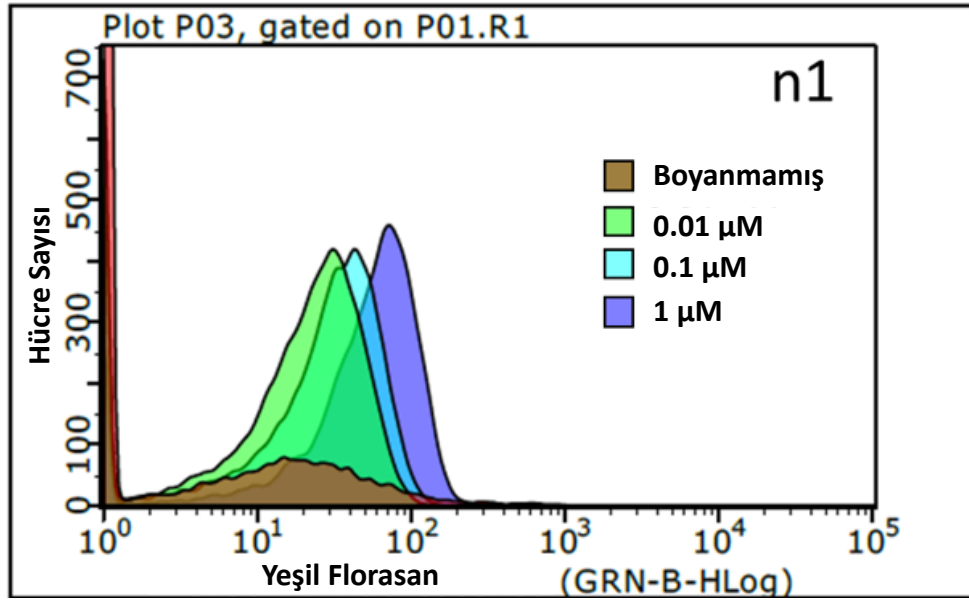
4.2. Nükleolin Aptamer Kapılarının ve Silika Konjugatlarının Hedeflenmesi

Bu çalışmada kullanılan aptamer kapı yapısının hedef protein nükleolin varlığında moleküler konformasyon değiştirme özelliği FRET (Förster Resonance Energy Transfer) analizi ile tespit edilmiştir. Şekil 4.2.1’de gösterildiği şekilde BSA (Bovine serum albumin) ile yapılan deneyde aptamer kapı yapısı 17.213 RFU (relative fluorescence units) sinyal vermektedir (siyah çizgi). Nükleolin proteini eklendiğinde ise sinyalin arttığı izlenmiştir; 10 nM için 96.102 RFU, 100 nM için 278.666 RFU ve 500 nM için 443.699 RFU olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.2.1: Nükleolin aptamer kapı yapısının 10, 100 ve 500 nM nükleolin proteini eklenerek FRET analizi ile açılma özelliğinin incelenmesi.

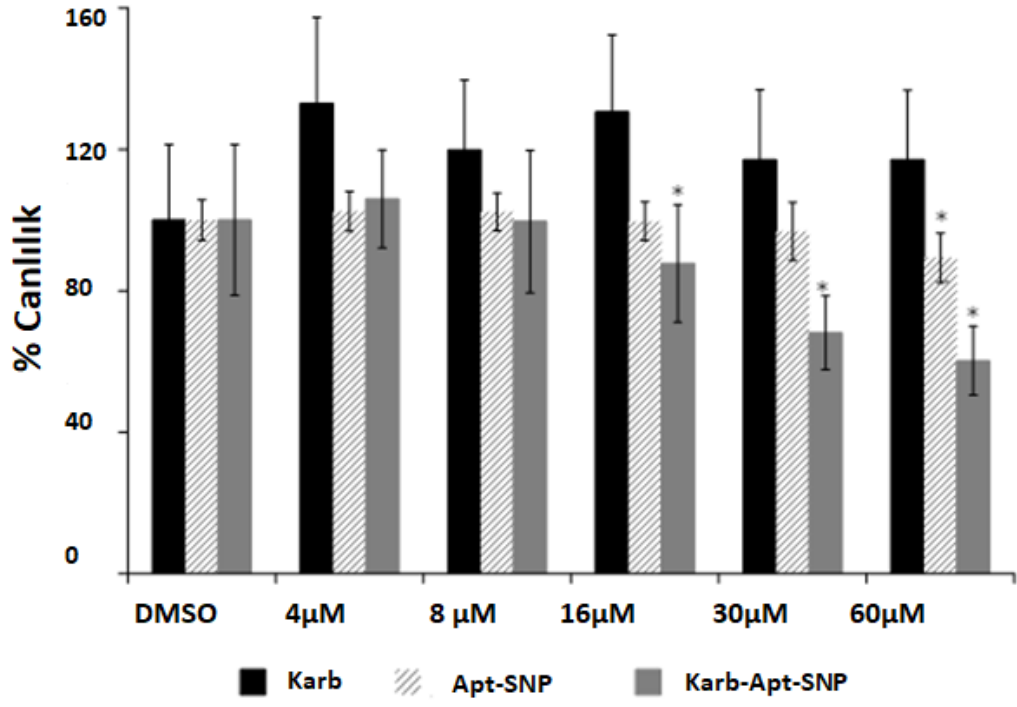
FRET analizi ile 0.01, 0.1 ve 1 μM konsantrasyonunda floresan işaretli aptamerin 4 saatlik bir inkübasyon sonunda kapı yapısının HeLa hücrelerine olan hedefleme kapasitesi akış sitometrisi ile çalışılmıştır. Aptamer dozu arttıkça hücre yüzeyine olan bağlanmanın arttığı gözlenmiştir. Kontrol hücreleri ile 1 μM aptamer ile inkübe edilmiş hücreler karşılaştırıldığında ortalama floresan sinyali 1.1×10^1 seviyesinden 1.9×10^1 seviyesine çıktığı bulunmuştur. Ayrıca floresan sinyaline sahip hücre sayısı 1.9×10^1 sinyal için 450 HeLa sayısına ulaşmaktadır. Floresan sinyal gösteren hücreler 1.1×10^2 florsan seviyesine kadar ulaşmıştır.



Şekil 4.2.2: Floresan işaretli nükleolin aptamer kapı yapısının HeLa hücrelerini hedefleme özelliklerinin akış sitometrisi ile çalışılması.

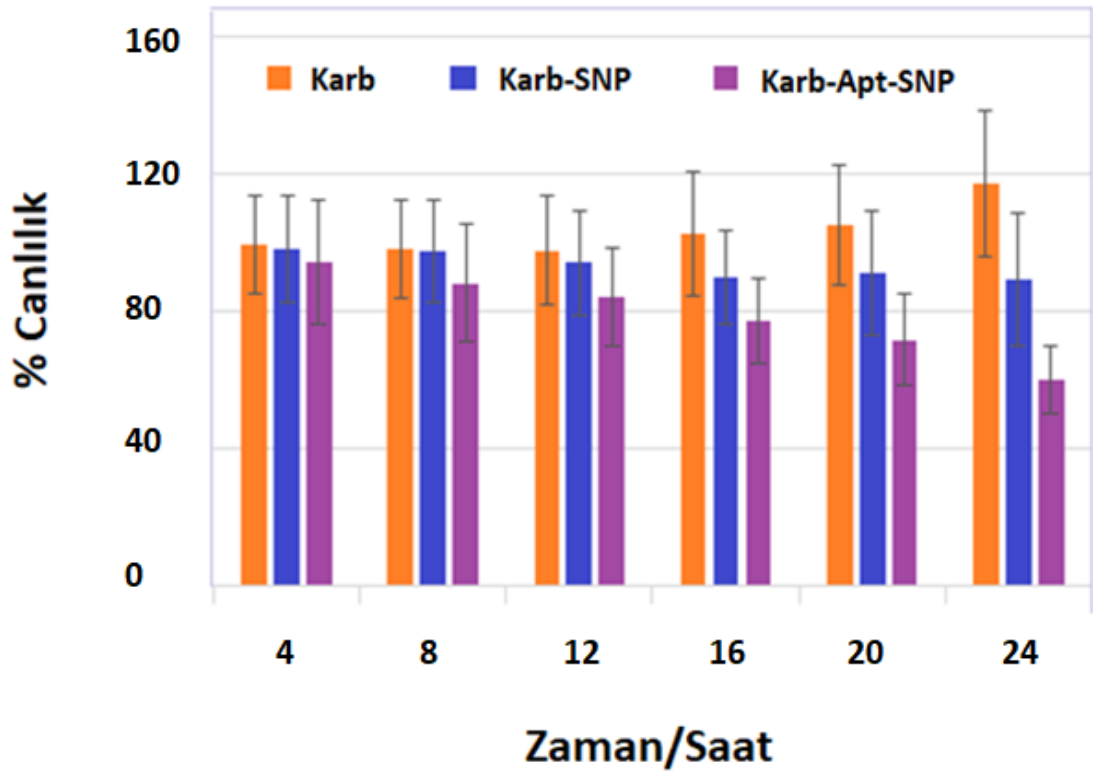
4.3. Karbendazim ve Karb-Apt-Snp'lerin Hela Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkileri

CCK-8 metodu ile 4, 8, 15, 30 ve 60 μM karbendazim, aynı miktarlarda karbendazim içeren aptamer kapı ile kaplanmış silika nanopartiküller (Karb-Apt-SNP) ile inkübe edildikten sonra proliferasyon değerleri canlılık göstergesi olarak kullanılmıştır (Şekil 4.3.1). Karb-Apt-SNP miktarı CCK-8 metodunun uygulamasında kullanılan 24 saat sonundaki salım miktarına göre hesaplanmıştır. DMSO (Dimethyl sulfoxide) deneyi nanopartikül konjugatlarının çözülmesi için kullanıldığından kontrol deneylerine eklenmiştir. 15 μM karbendazim uygulamasına kadar olan deneylerde hücre canlılığı açısından istatistiksel bir farklılık görülmemiştir ($n = 3, p < 0.05$) (Şekil 4.3.1).



Şekil 4.3.1: HeLa hücrelerinin değişik karbendazim (Karb), Apt-SNP veya Karb-Apt-SNP ile inkübe edildikten sonra CCK-8 metodu ile belirlenmiş canlılık oranları. İstatistiksel analiz sonuçları * ile gösterilmiştir.

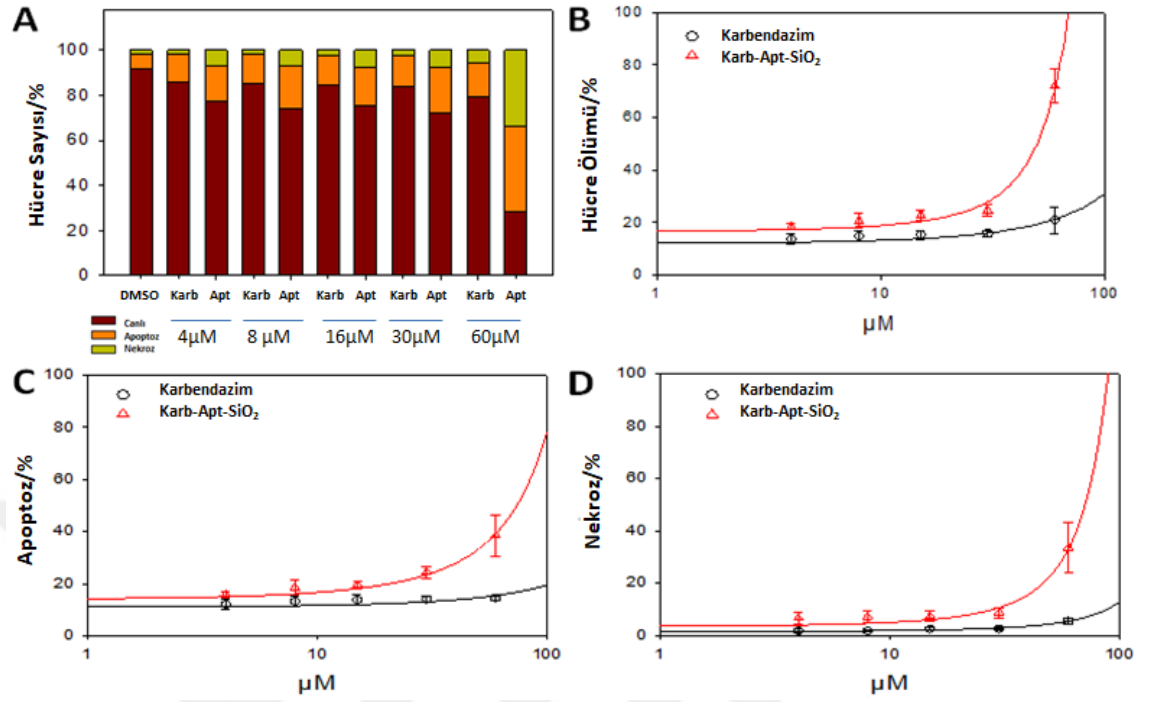
Karb-Apt-SNP konjugatları ile yapılan denemeler hücre canlılığını kontrol denemesi olan DMSO'ya göre 30 μM için %68.17, 60 μM için %60.26'ya kadar azaltmıştır. Diğer kontrol denemesi olan Apt-SNP hücre canlılığında genelde bir değişikliğe neden olmamış, sadece 60 μM için bir miktar azalmaya neden olmuştur. Öte yandan karbendazim ile yapılan denemelerde 60 μM 'ye kadar herhangi bir hücre canlılık farkı görülmemiştir. Zamana karşı 60 μM için yapılan denemelerde Karb-Apt-SNP konjugatlarının hücre canlılığını 24 saat için artarak düşürdüğü gözlenmiştir (Şekil 4.3.2).



Şekil 4.3.2: CCK-8 tayin metodu ile 60 μM karbendazim için zamana karşı hücre canlılık analizi.

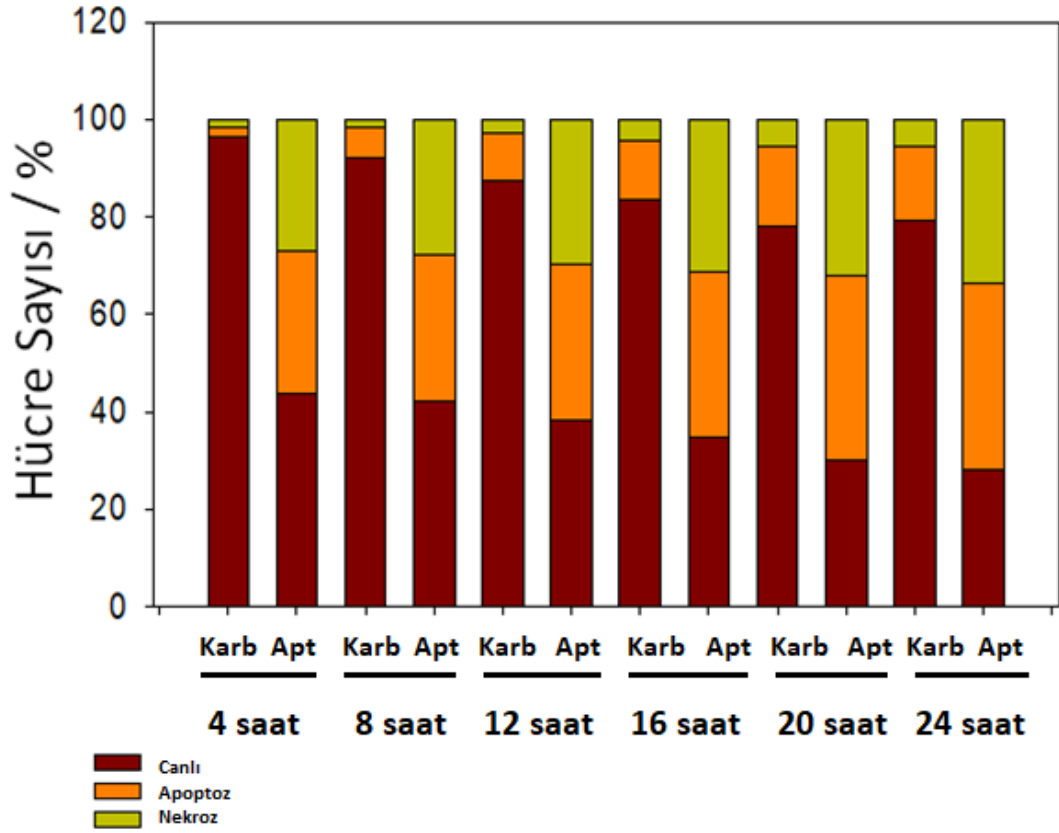
4.4. Apoptoz / Nekroz Deneyleri

Hücre ölüm mekanizmasını anlayabilmek için Annexin/PI (propidium iodide) metodu ile apoptoz veya nekroz yaparak canlılığını yitiren hücrelerin oranı bulunmuştur (Şekil 4.4.1). Bir gün süreli yapılan deneyler sonucunda karbendazim ile yapılan deneylerde hücre ölümünün apoptoz ve nekroz ile olduğu saptanmıştır. Fakat Karb-Apt-SNP deneylerinde yine deneylerde hücre ölümünün apoptoz ve nekroz ile olduğu görülmesi yanında, nekroz ile ölümün oranının arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.4.1-A). Karb-Apt-SNP konjugatları hücre ölümüne konsantrasyona bağlı olarak neden olduğu ve IC_{50} değerinin $46 \mu M$ olduğu hesaplanmıştır (Şekil 4.4.1-B). Sadece karbendazim ile yapılan deneylerde IC_{50} değeri $150 \mu M$ 'un üzerindedir. Apoptoz analizi ise karbendazim için $266.8 \mu M$ olan IC_{50} değerinin Karb-Apt-SNP konjugatları ile $73.9 \mu M$ 'a düştüğü görülmüştür (Şekil 4.4.1-C). Nekroz değerleri ise yine Karb-Apt-SNP konjugatları ile IC_{50} 164.1 değerinden $71 \mu M$ 'a düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.4.1-D).



Şekil 4.4.1: Karbendazimin HeLa hücrelerini inhibisyon mekanizması. A) Canlı, apoptoz ve nekroz olan hücrelerin oranı Annexin/PI yöntemi ile belirlenmiştir, B) Ölü hücreler (Apoptoz ve nekroz ile), C) Apoptoz olan hücreler ve D) Nekroz olan hücreler.

60 μM Karbendazim için zamana göre yapılan deneylerde hücre ölümünün sonuçları Şekil 4.4.2’de görülmektedir. Dört saatten başlayarak 24 saate kadar apoptoz ve nekroz nedeniyle hücre ölümü artmakta olduğu görülmüştür.



Şekil 4.4.2: Canlı, apoptoz yapan ve nekroz olan hücrelerin oranlarının zamana göre analizi.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Karbendazim yüklü ve aptamer hedefli MCM-41 tipi düzenli hekzagonal mezoporlara sahip nanopartiküller literatürde bulunan sol-jel yöntemiyle sentezlenmiştir (Kavruk vd., 2015). TEM ve DLS analizi 221 nm hidrodinamik çapa sahip yuvarlak morfolojisi olan nanopartiküllerin elde edildiğini göstermiştir. Zeta potansiyel analizi ile sentezlenen partiküllerin önce epoksi grupları ile kaplanması ve ardından bu gruplara amino işaretli aptamer dizilerinin kovalent olarak sabitlenmesi sonucunda yüzey potansiyel değerleri -48.4 mV seviyesine kadar ulaşmıştır. Bu çalışmada kullandığımız silika nanopartiküllerin yüzeyleri -15 mV potansiyele sahiptir, negatif yüklüdür. İçerisinde buldukları solüsyonun pH değerine bağlı olarak yüzey potansiyelleri değişecektir. Nötral pH değerleri civarında izoelektrik noktasına yakın olmakta ve hidrofobik agregasyon eğilimleri vardır. Fakat -34 mV'un altında yüzey potansiyellerine ulaştığında kararlı partiküller haline geldikleri daha önce gösterilmiştir (Junior ve Baldo 2014). Bu potansiyel değerlerinde izoelektrik noktasından uzaklaşarak yüzey yükü nedeniyle elektrostatik itme kuvveti nedeniyle partikül olarak kararlı halde bulunabilmektedirler.

Karbendazimin sitotoksik etkileri silika nanopartikülleri içerisinde HeLa hücreleri için daha önce çalışılmıştır (Sergio vd., 2015). Bu çalışmalarda silika nanopartiküllerin değişik fiziksel koşullarda absorpsiyon ve salım kinetikleri farklı pH, sıcaklık, iyonik içerikte gösterilmiştir. Absorpsiyon verimi nötral pH, düşük iyonik içerik ve düşük

sıcaklıklarda arttığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle bu tez çalışmasında kararlı nanopartiküller elde edebilmek için pH=7.4 olan PBS tamponu kullanılmıştır.

Geliştirilen hedefli silika içerisinde karbendazim taşıma sisteminin en önemli özelliği aptamer kapı yapısının kullanılmasıdır. AS1411 aptameri nükleolin proteinine yüksek afinitesi bilinen ve sıklıkla kanser hücrelerinin hedeflenmesinde kullanılmış bir aptamerdir (Bates vd., 2009; Bates vd., 2017). Aptamer kapı yapısının ilaç taşımada kullanılması bakteri veya meme kanseri hücrelerinde daha önce başarıyla gösterilmiştir (Hernandez vd., 2013 ; Kavruk vd., 2015). Bu nedenle öncelikle aptamer kapı yapısının moleküler konformasyon değiştirme özelliği (kapının hedefe göre açılıp, kapanması) FRET yöntemiyle test edilmiş ve nükleolin bağlanması ile saç tokası yapısının bozulduğu gösterilmiştir. Daha sonra aptamer kapısının HeLa hücrelerine olan afinitesi akış sitometrisi ile çalışılmış ve 4 saatlik bir deneyde yüksek afinitenin meme kanseri hücreleri yanında HeLa hücreleri içinde geçerli olduğu gösterilmiştir. Bu bağlanma sonrasında 2 saat içerisinde nükleolin aptamerlerinin hücre içine alındığı daha önceki bir çalışmada gösterilmiştir (Reyes-Reyes vd., 2010).

Sentezlenen Karb-Apt-SNP'lerin sitotoksik etkilerinin çalışılmasında CCK-8 kolorimetrik ve hücre ölümü mekanizmasını çalışmak için Annexin/PI floresan apoptoz/nekroz tayin sistemleri kullanılmıştır. Öncelikle Karb-Apt-SNP'lerin spesifik olarak HeLa hücreleri üzerinde 60 µM karbendazim düzeyinde 24 saat içerisinde % 60'a kadar canlılığın düşürüldüğü gösterilmiştir. Apoptoz/nekroz ise IC₅₀ değerlerinin karşılaştırılması yolu ile çalışılmıştır. Sağlıklı hücrelerde programlı hücre ölümü veya

otofaji mekanizmaları tümör gibi istenmeyen hücrelerin vücuttan uzaklaştırılmalarını sağlamaktadır. Bu çalışmada Karb-Apt-SNP'lerin etki mekanizmaları apoptoz/nekroz çalışmasıyla belirlenmiştir. Nekroz kontrolsüz hücre ölümüne neden olurken, apoptoz hücre içerisinde belirli yolların uyarılmasıyla hücrenin kendisini kontrollü bir şekilde yok etmesi demektir. Bu nedenle ilaç etkisinin nekroz ile değil apoptoz yoluyla olması tercih edilir. Bazı nanopartiküllerin nekroza neden olarak hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Sharifi vd., 2019).

Nanopartiküllerin spesifik olmayan bu genel hücre toksisitesi nekroz belirlenmesi yoluyla çalışılabilir ve bu çalışmada kullanıldığı gibi hedefleme ile spesifik olarak tümör hücrelerinin yok edilmesinde kullanılarak yan etkileri azaltılabilir. Örneğin, 5-15 nm boyutundaki silika nanopartiküllerinin yüksek miktarda (100 µg) kullanılmasıyla gliyoblastoma hücrelerinde %10 nekroz ve %30 apoptoz görüldüğü tespit edilmiştir (Kretowski vd., 2017). Bu çalışmada ise kullanılan 213 nm boyutundaki silika nanopartikül ile nekroz veya apoptoz görülmemiştir. Bu sonuçlar başka bir çalışmada 243 nm boyutundaki silika-aptamer konjugatlarında da nekroz veya apoptoz etkisinin HeLa hücrelerinde ve sgc8 aptamer-silika konjugatları ile lösemi hücrelerinde görülmemesiyle de uyumludur (Schütz vd., 2016 ; Tan vd., 2016). Bu nedenle bu çalışmada Karb-Apt-SNP ile gözlenen nekroz veya apoptoz kaynaklı hücre ölümlerinin karbendazimden kaynaklandığı kanıtlanmıştır.

Metil-benzimidazol-karbamat fungusitlerinin túbülin dimerlerindeki b-túbülin proteinine bağlandığı ve GTP-túbülin dimerlerin entegrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu inhibisyon mikrotúbül instabiliteye ve depolimerizasyona, hücre bölünmesinin durmasına ve sonunda hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu mekanizmanın ayrıntıları tam olarak açığa çıkarılamamış olsa da hücre bölünmesinin G2/M fazda durdurulduğu ispatlanmıştır (NIH, 2013). Karbendazim ile yapılan bir çalışmada ise hücrelerin G0/G1 fazında durdurulduğu gözlenmiştir (Zhou vd., 2015). HeLa hücrelerinin karbendazime dirençli olduğu bilinmektedir. Bu direcin mekanizması bilinmese de funguslarla yapılan çalışmalar bu mekanizmasının túbülin genindeki noktasal mutasyonlar olabileceğine işaret etmektedir (Xu vd., 2019).

Sonuç olarak karbendazim anti-proliferasyon özellikleri nedeniyle potansiyel olarak kemoterapide kullanılacak bir anti-kanser ilacı olarak düşünülmektedir. Karbendazimin silika nanopartiküller içerisinde aptamer hedeflemesi ile kullanılması servikal tümör hücrelerinde doğal olarak bulunan ilaç direncinin aşılmasında kullanılacağı öngörülmektedir. Bu yolla yüksek miktarda kullanıldığında insan hücrelerine ölümcül etkisi olduğu bilinen karbendazimin yan ve olumsuz etkilerinin azaltılarak kanser tedavisinde kullanılan bir ilaç olması sağlanabilir. Bu çalışmanın sonuçları hedefli karbendazim ilaç taşıma sistemi olarak silika nanopartiküllerin etkili bir terapi geliştirilmesinde kullanılabilme olasılığını göstermiştir.

6. KAYNAK DİZİNİ

- Abelow, A. E., Schepelina, O., White, R. J., Vallée-Bélisle, A., Plaxco, K. W., & Zharov, I.**, 2010, Biomimetic glass nanopores employing aptamer gates responsive to a small molecule. *Chemical communications* (Cambridge, England), 46(42), 7984–7986. <https://doi.org/10.1039/c0cc02649b>
- Abelow, A. E., & Zharov, I.**, 2012, Reversible nanovalves in inorganic materials. *Journal of Materials Chemistry*, 22(41), 21810-21818.
- Arbyn, M., Weiderpass, E., Bruni, L., de Sanjosé, S., Saraiya, M., Ferlay, J., & Bray, F.**, 2020, Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *The Lancet Global Health*, 8(2), e191-e203.
- Barbas, A. S., Mi, J., Clary, B. M., & White, R. R.**, 2010, Aptamer applications for targeted cancer therapy. *Future oncology*, 6(7), 1117-1126.
- Bates, P. J., Laber, D. A., Miller, D. M., Thomas, S. D., & Trent, J. O.**, 2009, Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, 86(3), 151-164. doi:10.1016/j.yexmp.2009.01.004
- Bates, P. J., Reyes-Reyes, E. M., Malik, M. T., Murphy, E. M., O'toole, M. G., & Trent, J. O.**, 2017, G-quadruplex oligonucleotide AS1411 as a cancer-targeting agent: Uses and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1861(5), 1414-1428.
- Bayraç, C.** 2014, Generation Of Aptamer Against Salmonella Serovar Enteritidis And Development Of Aptamer-Based Capillary Biosensor (Doctoral dissertation, Middle East Technical University).
- Bizzarri, N., Ghirardi, V., Alessandri, F., Venturini, P. L., Valenzano Menada, M., Rundle, S., ... & Ferrero, S.**, 2016, Bevacizumab for the treatment of cervical cancer. *Expert opinion on biological therapy*, 16(3), 407-419.
- Borsa, B.A., Tuna, B.G., Hernandez, F.J., Hernandez, L.I., Bayramoglu, G., Arica, M.Y. and Ozalp, V.C.**, 2016, “Staphylococcus aureus detection in blood samples by silica nanoparticle-oligonucleotides conjugates”, *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 27-32.
- Carvalho, J., Paiva, A., Campello, M. P. C., Paulo, A., Mergny, J. L., Salgado, G. F., ... & Cruz, C.**, 2019, Aptamer-based targeted Delivery of a G-quadruplex Ligand in Cervical Cancer Cells. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
- Chai, C., Xie, Z., & Grotewold, E.**, 2011, SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment), as a powerful tool for deciphering the protein–DNA interaction space. In *Plant Transcription Factors* (pp. 249-258). Humana Press.
- Chung, J.**, 2017, Special issue on therapeutic antibodies and biopharmaceuticals. *Experimental & molecular medicine*, 49(3), e304-e304.
- Climent, E., Mondragón, L., Martínez-Mañez, R., Sancenón, F., Marcos, M. D., Murguía, J. R., ... & Pérez-Payá, E.**, 2013, Selective, highly sensitive, and rapid detection of genomic DNA by using gated materials: Mycoplasma detection. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(34), 8938-8942.

- Ercan, M., Ozalp, V. C., & Tuna, B. G.** 2017, Genotyping of single nucleotide polymorphism by probe- gated silica nanoparticles. *Analytical biochemistry*, 537, 78-83.
- Goyal, K., Sharma, A., Arya, R., Sharma, R., Gupta, G. K., & Sharma, A. K.**, 2018, Double edge sword behavior of carbendazim: a potent fungicide with anticancer therapeutic properties. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 18(1), 38-45.
- Hermanson, G. T.**, 2013, *Bioconjugate techniques*. Academic press.
- Hernandez, F. J., Hernandez, L. I., Pinto, A., Schäfer, T., & Özalp, V. C.**, 2013, Targeting cancer cells with controlled release nanocapsules based on a single aptamer. *Chemical communications*, 49(13), 1285-1287.
- Hidding, J.**, 2016, A therapeutic battle: Antibodies vs. Aptamers. *Nanoscience master program*, 1-20.
- Huang, Y. W., Cambre, M., & Lee, H. J.**, 2017, The toxicity of nanoparticles depends on multiple molecular and physicochemical mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2702.
- Isah, T.**, 2015, Natural sources of taxol. *Br J Pharm Res*, 6(4), 214-27.
- Jeevanandam, J. Barhoum, A. Chan, Y. S. Dufresne, A. & Danquah, M. K.**, 2018, Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein journal of nanotechnology*, 9(1), 1050-1074.
- Jenkins, D.**, 2020, A Brief History of Cervical Cancer. In *Human Papillomavirus* (pp. 1-12). Academic Press
- Junior J.A.A., Baldo, J.B.**, 2014. The Behavior of Zeta Potential of Silica Suspensions. *New Journal of Glas and Ceramics*, 4, 29-37
- Kavruk, M., Celikbicak, O., Ozalp, V. C., Borsa, B. A., Hernandez, F. J., Bayramoglu, G., ... & Arica, M. Y.**, 2015, Antibiotic loaded nanocapsules functionalized with aptamer gates for targeted destruction of pathogens. *Chemical Communications*, 51(40), 8492-8495.
- Köhler, G., & Milstein, C.**, 1975, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *nature*, 256(5517), 495-497.
- Krętownski, R., Kusaczuk, M., Naumowicz, M., Kotyńska, J., Szynaka, B., & Cechowska-Pasko, M.**, 2017, The Effects of Silica Nanoparticles on Apoptosis and Autophagy of Glioblastoma Cell Lines. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 7(8), 230. doi:10.3390/nano7080230
- Lee, J. O., So, H. M., Jeon, E. K., Chang, H., Won, K., & Kim, Y. H.**, 2008, Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 390(4), 1023-1032.
- Lee, S. J., Yang, A., Wu, T. C., & Hung, C. F.**, 2016, Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. *Journal of gynecologic oncology*, 27(5).
- Liu, J. K.**, 2014, The history of monoclonal antibody development—progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of Medicine and Surgery*, 3(4), 113-116.

- Marupudi, N. I., Han, J. E., Li, K. W., Renard, V. M., Tyler, B. M., & Brem, H.,** 2007, Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. *Expert opinion on drug safety*, 6(5), 609-621.
- Masoud, V., & Pagès, G.,** 2017, Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World journal of clinical oncology*, 8(2), 120.
- Mohajeri, M., & Sahebkar, A.,** 2018, Protective effects of curcumin against doxorubicin-induced toxicity and resistance: A review. *Critical reviews in oncology/hematology*, 122, 30-51.
- Mongelard, F., & Bouvet, P.,** 2007, Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends in cell biology*, 17(2), 80-86.
- NIH,** 2013, Carbendazim in Treating Patients With Advanced Solid Tumors or Lymphoma. Retrieved from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00023816>
- Nimjee, S. M., White, R. R., Becker, R. C., & Sullenger, B. A.,** 2017, Aptamers as Therapeutics. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 57, 61–79.
- Oroval, M., Climent, E., Coll, C., Eritja, R., Aviñó, A., Marcos, M. D. & Amorós, P.,** 2013, An aptamer-gated silica mesoporous material for thrombin detection. *Chemical Communications*, 49(48), 5480-5482.
- Ozalp, V. C., Eyidogan, F., & Oktem, H. A.,** 2011, Aptamer-gated nanoparticles for smart drug delivery. *Pharmaceuticals*, 4(8), 1137-1157.
- Ozalp, V. C., & Schäfer, T.,** 2011, Aptamer-based switchable nanovalves for stimuli-responsive drug delivery. *Chemistry–A European Journal*, 17(36), 9893-9896.
- Parkin, D. M., & Bray, F.,** 2006, The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, 24, S11-S25.
- Pascual, L., Cerqueira-Coutinho, C., Garcia-Fernandez, A., de Luis, B., Bernardes, E. S., Albernaz, M. S., Missailidis, S., Martinez-Manez, R., Santos-Oliveira, R., Orzaez, M. and Sancenon, F.,** 2017, "MUC1 aptamer-capped mesoporous silica nanoparticles for controlled drug delivery and radio-imaging applications." *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* 13(8), 2495-2505.
- Patel, A. G., & Kaufmann, S. H.,** 2012, Cancer: How does doxorubicin work?. *Elife*, 1, e00387.
- Pectasides, D., Fountzilas, G., Papaxoinis, G., Pectasides, E., Xiros, N., Sykiotis, C., ... & Economopoulos, T.,** 2009, Carboplatin and paclitaxel in metastatic or recurrent cervical cancer. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 19(4), 777-781.
- Reyes-Reyes, E. M., Teng, Y., & Bates, P. J.,** 2010, A new paradigm for aptamer therapeutic AS1411 action: uptake by macropinocytosis and its stimulation by a nucleolin-dependent mechanism. *Cancer Research*, 70(21), 8617-8629. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0920
- Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C., & Wacholder, S.,** 2007, Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 370(9590), 890-907.
- Sergio L. Laurella, C. M. P. D., Ileana D. Lick, Patricia E. Allegretti and Mauricio F., & Erben.,** 2015, Evaluation of Silica as an Adsorbent for Carbendazim from Aqueous Solutions. *International Journal of Engineering and Technical Research*, 3(2), 96-101.

- Sharifi, M., Hosseinali, S. H., Saboury, A. A., Szegezdi, E., & Falahati, M.,** 2019, Involvement of planned cell death of necroptosis in cancer treatment by nanomaterials: Recent advances and future perspectives. *Journal of Controlled Release*, 299, 121-137. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.007>
- Silaghi, M. C., Chizallet, C., & Raybaud, P.,** 2014, Challenges on molecular aspects of dealumination and desilication of zeolites. *Microporous and Mesoporous Materials*, 191, 82-96.
- Sun, H., Zhu, X., Lu, P. Y., Rosato, R. R., Tan, W., & Zu, Y.,** 2014, Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 3, e182.
- Schütz, I., Lopez-Hernandez, T., Gao, Q., Puchkov, D., Jabs, S., Nordmeyer, D., Haucke, V.,** 2016, Lysosomal Dysfunction Caused by Cellular Accumulation of Silica Nanoparticles. *J Biol Chem*, 291(27), 14170-14184. doi:10.1074/jbc.M115.710947.
- Tan, J., Yang, N., Hu, Z., Su, J., Zhong, J., Yang, Y. Zhao, Y.,** 2016, Aptamer-Functionalized Fluorescent Silica Nanoparticles for Highly Sensitive Detection of Leukemia Cells. *Nanoscale Research Letters*, 11(1), 298-298. doi:10.1186/s11671-016-1512-8.
- Thi, T. T. H., Nguyen, T. N. Q., Hoang, D. T., & Nguyen, D. H.,** 2019, Functionalized mesoporous silica nanoparticles and biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*.
- Tuna, B. G., Atalay, P. B., Kuku, G., Acar, E. E., Kara, H. K., Yilmaz, M. D., & Ozalp, V. C.,** 2019, Enhanced antitumor activity of carbendazim on HeLa cervical cancer cells by aptamer mediated controlled release. *RSC Advances*, 9(62), 36005-36010.
- W. H. O. (WHO),** 2018, Cervical Cancer, erişim tarihi 31.12.2018.
- Wakharde, A. A., Awad, A. H., Bhagat, A., & Karuppayil, S. M.,** 2018, Synergistic Activation of Doxorubicin against Cancer: A Review. *Am J Clin Microbiol Antimicrob.* 2018; 1(2), 1009.
- Xu, S., Wang, J., Wang, H., Bao, Y., Li, Y., Govindaraju, M., Zhang, M.,** 2019, Molecular characterization of carbendazim resistance of *Fusarium* species complex that causes sugarcane pokkah boeng disease. *BMC Genomics*, 20(1), 115. doi:10.1186/s12864-019-5479-6
- Yazdian-Robati, R., Bayat, P., Oroojalian, F., Zargari, M., Ramezani, M., Taghdisi, S. M., & Abnous, K.,** 2019, Therapeutic applications of AS1411 aptamer, an update review. *International journal of biological macromolecules*.
- Yenjerla, M., Cox, C., Wilson, L., & Jordan, M. A.,** 2009, Carbendazim inhibits cancer cell proliferation by suppressing microtubule dynamics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(2), 390-398.
- Zhang, D., Yang, R., Wang, S., & Dong, Z.,** 2014, Paclitaxel: new uses for an old drug. *Drug design, development and therapy*, 8, 279.
- Zhang, X., Soori, G., Dobleman, T. J., & Xiao, G. G.,** 2014, The application of monoclonal antibodies in cancer diagnosis. *Expert review of molecular diagnostics*, 14(1), 97-106.
- Zhong, Y., Zhao, J., & Chen, F.,** 2020, Advances of aptamers screened by Cell-SELEX in selection procedure, cancer diagnostics and therapeutics. *Analytical Biochemistry*, 113620.

Zhou, J. H., Xiong, K., Yang, Y., Ye, X. Q., Liu, J., & Li, F. X., 2015, Deleterious effects of benomyl and carbendazim on human placental trophoblast cells. *Reproductive Toxicology*, 51, 64-71. doi:10.1016/j.reprotox.2014.12.008

Zhu, C.L., Lu, C.H., Song, X.Y., Yang, H.H., Wang, X.R., 2011, Bioresponsive Controlled Release Using Mesoporous Silica Nanoparticles Capped with Aptamer-Based Molecular Gate. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 5, 1278-1281.



